Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON NIKOTINSÄURE AUS DEN NIKOTINSÄUREANTIMETABOLITEN 3-ACETYLPYRIDIN UND PYRIDIN-3-METHYLCARBINOL

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Frank-Peter Heidinger
aus Berlin

1968

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans HERKEN

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON NIKOTINSÄURE AUS DEN NIKOTINSÄUREANTIMETABOLITEN 3-ACETYLPYRIDIN UND PYRIDIN-3-METHYLCARBINOL

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Frank-Peter Heidinger
aus Berlin

Dekan:	Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier
Referent:	Professor Dr. med. Wolfgang Koransky
Korreferent:	Professor Dr. med. Diether Neubert

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 23. Juli 1968

FÜR

MEINE ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552705_0057

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

Einleitung 6

Methoden 13

I. Substanzen 13

II. Darstellung der Methyljodide 18

III. Darstellung des Nikotinsäuremethylesters 18

IV. Cofermente 19

V. Tierversuche 20

a) Tiermaterial 20

b) Präparation von Leber- und Nierengewebe 20

VI. Isolierung, Identifizierung und quantitative Bestimmung der Metaboliten 23

a. Dünnschichtchromatographie 23

b. Spektrophotometer 25

c. Radiochromatogramme 25

d. Gaschromatographie 25

e. Kontaktphotographie 26

f. Quantitative Bestimmung der Radioaktivität 26

g. Isotopenverdünnungsanalyse 26

Ergebnisse 28

A. Reinigung von käuflichem 3-Acetylpyridin und Identifizierung der Begleitstoffe 28

Biologische Versuche mit den Begleitstoffen 34

B. Untersuchungen über den Abbau von 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-Methylcarbinol 37

I. Isolierung von radioaktivem 3-Acetylpyridin, Pyridin-3-Methylcarbinol, Nikotinamid und Nikotinsäure aus ganzen Ratten nach Gabe von tritiiertem 3-Acetylpyridin 37

Seite

II. Isolierung von 3-Acetylpyridin, Pyridin-3-Methylcarbinol, Nikotinamid, Nikotinsäure, Pyridyl-äthandiol und ω -Oxyacetylpyridin aus ganzen Ratten nach Gabe von Pyridyl-3-Methylcarbinol 48

C. Untersuchungen des Stoffwechsels von 3-Acetylpyridin in vitro 57

Versuche mit:

1. 3-Acetylpyridin 57
2. Pyridin-3-Methylcarbinol 67
3. (3-Pyridyl)-1,2 äthandiol 69
4. ω -Oxyacetylpyridin 70
5. Pyridyl-3-glykolsäure 71
6. Pyridyl-3-glyoxylsäure 72

Ergebnisse der Untersuchungen in vitro 78

D. Die Oxydation von 3-Acetylpyridin am Ring 80

1. Versuche mit Aldehydoxydase 82
2. Pyridonsynthese in Gegenwart von Leberhomogenat 86

Versuche mit

I. 3-Acetylpyridin 86
II. N-Methyl-3-Acetylpyridin 92
III. N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon 94

3. Vergleichende Untersuchungen der Pyridonbildung aus 3-Acetylpyridin und N-Methyl-3-Acetylpyridin in vivo 95

I. Versuche mit 3-Acetylpyridin 95
II. Versuche mit N-Methyl-3-Acetylpyridin 97

Seite

Diskussion 99

Zusammenfassung 105

Abkürzungen 108

Literaturverzeichnis 109

Verzeichnis der Abbildungen

		Seite
Abb. 1	Schema von McKENNIS über den Stoffwechsel des 3-Acetylpyridin	11
Abb. 2	UV-Spektren von 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-Methylcarbinol	15
Abb. 3	UV-Spektren von (3-Pyridyl)-1,2 äthandiol und ω -Oxyacetylpyridin	16
Abb. 4	UV-Spektren von Pyridyl-3-glykolsäure und Pyridyl-3-glyoxylsäure	17
Abb. 5	Dünnschichtchromatogramm eines Inkubates von käuflichem 3-Acetylpyridin	29
Abb. 6	UV-Spektren der Verunreinigungen, die in käuflichem 3-Acetylpyridin enthalten sind	31
Abb. 7a	Dünnschichtchromatographische Isolierung der Verunreinigungen	32
Abb. 7b	Retentionszeiten der Verunreinigungen bei Gaschromatographie	32
Abb. 8	Dünnschichtchromatographische Trennung von Inkubaten mit 3-Acetylpyridin	59

		Seite
Abb. 9	Dünnschichtchromatographische Isolierung und UV-Spektrum von Nikotinsäure aus Inkubaten mit Pyridyl-3-glyoxylsäure	75
Abb.10	Schema zur möglichen Entstehungsweise der Pyridone von 3-Acetylpyridin und N-Methyl-3-Acetylpyridin	81
Abb.11a	Extinktionszunahme in Ansätzen mit N-Methyl-3-Acetylpyridin und "Aldehydoxydase"	84
Abb.11b	UV-Spektrum des isolierten N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon	84
Abb.12	UV-Spektrum von 3-Acetyl-6-Pyridon	88
Abb.13	Dünnschichtchromatographische Trennung von methyliertem und nicht methyliertem 3-Acetyl-6-Pyridon	91

Experimentelle Untersuchungen zur Bildung von Nikotinsäure aus den Nikotinsäureantimetaboliten 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-Methylcarbinol

Im Tierexperiment ist 3-Acetylpyridin (3-Ap)+ eine toxische Substanz, die sowohl akute als auch chronische Vergiftungen hervorruft. Bei der akuten Intoxikation stehen Symptome von seiten des Zentralnervensystems im Vordergrund, die HERKEN und Mitarbeiter (11,12) bei Versuchen an Ratten studiert haben.
WOOLLEY et al. (46,47) untersuchten die Wirkung einer Reihe von Pyridinverbindungen an Hunden, bei denen sich infolge von Nikotinamidmangel das Krankheitsbild der "black-tongue" entwickelt hatte, und stellten fest, daß die Gabe von 3-Ap zu einer Verstärkung der Symptome bis zum Tod der Tiere führte. WOOLLEY (47) konnte weiterhin zeigen, daß bei Mäusen, denen er 3-Ap verabfolgte, die Zeichen des Nikotinsäuremangels auftraten. Gleichzeitige Gabe von Nikotinsäure (Ns) schützte vor dieser Vitaminmangelerkrankung. Auf Grund dieser Befunde und wegen der chemischen Ähnlichkeit mit der Ns faßte WOOLLEY (47) den 3-Ap-Effekt als Ns-Antivitaminose auf.
KAPLAN und Mitarbeiter (26,27) konnten bei Untersuchungen mit Präparationen aus Leukämiezelltumoren und aus Taubenhirn zeigen, daß 3-Ap in die Codehydrogenasen an Stelle des Nikotinsäureamid (NA) eingebaut wird. Es war naheliegend, die Erklärung für die Antivitaminwirkung

---

+) Für häufig genannte Verbindungen werden im Text Abkürzungen benutzt. Eine Liste der Abkürzungen findet sich im Anschluß an die Zusammenfassung.

von 3-Ap in der Bildung von Analogen der Codehydrogenasen zu suchen, die an Stelle von NA 3-Ap enthalten. KAPLAN (28) prüfte die Fähigkeit von 3-Ap-Dinukleotid und 3-Ap-Dinukleotidphosphat, Wasserstoff zu übertragen, und fand, daß die Aktivität des NAD-Analogen teilweise sogar die der natürlichen Verbindung übertraf, während das NADP-Analoge eine bedeutend geringere wasserstoffübertragende Aktivität besaß.
COPER, HERKEN und BRUNNEMANN (7,8,11,12) untersuchten die Bildung von 3-Ap-Analogen der Codehydrogenasen in vitro und in vivo. Sie fanden, daß im Gehirn von Ratten, denen sie 3-Ap intra peritoneal verabfolgten, nur 5 - 10 % des gesamten NAD in 3-Ap-Dinukleotid umgewandelt wurden. In Gegenwart von Mikrosomenenzymen bildete sich viermal mehr 3-Ap-Analoges von NADP als von NAD. Diese Befunde bestätigten HERKEN und NEUHOFF (21), denen mittels mikroanalytischer Methode der Nachweis gelang, daß 6 Stunden nach Applikation von 3-Ap 3,7 % des NAD gegenüber 47 % des NADP in das 3-Ap-Analoge umgewandelt wurden. COPER und NEUBERT (13) untersuchten die Reaktionsgeschwindigkeit NADP-abhängiger Oxydoreduktasen aus Rattengehirn mit 3-Acetylpyridin-Adenindinukleotidphosphat als Coferment und stellten fest, daß dieser unnatürliche Wasserstoffüberträger eine geringere Aktivität als das NADP besitzt. Deshalb halten die Autoren es für möglich, daß die nach Gabe von 3-Ap auftretenden Schädigungen auf einer Störung der NADP-abhängigen Prozesse beruhen, wenn ein erheblicher Teil des NADP in das 3-Ap-Analoge umgewandelt ist. HERKEN, NEUHOFF und WILLING (22) untersuchten den Austausch von 3-Ap gegen NA in den Pyridinnukleotiden verschiedener Hirnregionen und fanden, daß im Hippocampus 44 - 48 % des NADP in 3-Ap-Dinukleotidphosphat überführt werden. Sie diskutierten deshalb

die Möglichkeit, daß in umschriebenen Hirngebieten der Anteil des 3-Ap-Analogen von NADP groß genug ist, um eine Hemmung des Wasserstofftransportes zu bewirken.

Auf Grund des zwischen 3-Ap und Ns bestehenden Antagonismus rechnen COPER und HERKEN (12) die Substanz zu den "Antivitaminen".

3-Ap darf jedoch nicht ausschließlich unter dem Aspekt eines Antivitamins betrachtet werden, denn KAPLAN und Mitarbeiter (30) teilten mit, daß 3-Ap und Pyridyl-3-Methylcarbinol (Py-3-MeC) die NAD-Bildung in der Leber der Maus stärker anregen als Ns. Die Zunahme an NAD nach 3-Ap-Gabe ist fast ebenso groß wie nach Applikation von NA. Wenn 3-Ap und Py-3-MeC im Sinne Kaplans als Provitamine wirken können, so muß daran gedacht werden, daß sie in Ns oder NA umgewandelt werden. Eine solche Umwandlung konnte BEHER (1) nachweisen. Er applizierte Hunden 3-Ap und stellte im Urin der Tiere eine stark erhöhte Ausscheidung von N-Methylnikotinamid (NM-NA) fest. Diese Substanz ist als Stoffwechselprodukt der Ns bekannt (32). Für weitere Untersuchungen verwendete BEHER (2) ^{13}C-markiertes 3-Ap. Da das aus dem Urin isolierte NM-NA dieses Isotop enthielt, muß es zur Bildung von NA aus 3-Ap gekommen sein. Die Möglichkeit, daß es sich um NA handelt, das durch 3-Ap aus den Codehydrogenasen verdrängt wurde, ist somit ausgeschlossen. In vitro inkubierte BEHER (4) Blutplasma und Gewebeschnitte von Leber, Niere und Muskulatur des Hundes mit 3-Ap. Er schloß aus der Abnahme des 3-Ap, daß die Substanz in Gegenwart von Gewebsschnitten die gleichen Veränderungen erfährt wie im lebenden Tier. In den Ansätzen mit Zellhomogenat von Leber, Niere und Muskulatur verminderte sich dagegen der Gehalt an 3-Ap nicht.

In weiteren Versuchen verabreichte BEHER (5) am endständigen Kohlenstoffatom der Seitenkette mit ^{14}C-markiertes 3-Ap an Ratten und fand 30 % der eingesetzten Radioaktivität im CO_2 der Atemluft. Aus der Leber der Tiere isolierte er Serin, dessen ß-Carboxylgruppe radioaktiv war. Daraufhin postulierte Beher drei mögliche Abbauwege, die von 3-Ap zu Ns führen könnten:

1. Oxydation der Seitenkette zur Ketokarbonsäure und nachfolgende Dekarboxylierung.

2. Abspaltung der endständigen Methylgruppe der Seitenkette als Formiat, das zu CO_2 oxydiert wird.

3. Übertragung der Methylgruppe auf Akzeptoren z.B. Glycin unter Bildung von Serin.

In der Diskussion seiner Ergebnisse weist BEHER (1) auf Parallelen zwischen dem Abbau von 3-Ap und Acetophenon hin, dessen Umwandlung zur Benzoesäure von DAIBER und THIERFELDER (14) beschrieben wurde.

Zwei weitere Metaboliten von 3-Ap fanden McKENNIS et al. (35) im Urin von Hunden. Es handelte sich um NA.-Pyridin-3-Methylcarbinol und 3-Pyridyl-1,2 äthandiol (Diol). McKennis stellt in dieser Arbeit ein Schema über den Stoffwechsel des 3-Ap zur Diskussion (Abb. 1).

Pyridin-3-Methylcarbinol (Py-3-MeC) isolierten KANIG und KOMANSKY (25) mittels Ionenaustauschchromatographie aus dem Gehirn von Ratten, die mit 3-Ap vergiftet waren. In pharmakologischen Untersuchungen, die KANIG (24) mit Py-3-MeC durchführte, erwies es sich als ebenso toxisch wie 3-Ap. Py-3-MeC hatten bereits BEHER und ANTHONY (3) als mögliches Abbauprodukt des 3-Ap angesehen. ÖSTERLE (41) beobachtete die Umwandlung von 3-Ap zu Py-3-MeC

in vitro. Py-3-MeC wird in vitro anstelle von NA in NAD und NADP eingebaut, wie BRUNNEMANN und COPER (9) zeigen konnten. Anders als die Analogen des 3-Ap übertragen diese Verbindungen keinen Wasserstoff (KAPLAN und CIOTTI [26], COPER und BRUNNEMANN [7]).

Außer Diol und NM-Py-3-MeC wurden von McKENNIS (36) im Urin von Hunden weitere Derivate von Py-3-MeC gefunden. Er isolierte das Glukuronid sowie das Sulfat dieser Substanz und eine Verbindung, die möglicherweise das Glukuronid des Diol darstellt. Das Py-3-MeC-Glukuronid war schon früher von NEUHOFF und KÖHLER (38) als Metabolit beschrieben worden.
Die Arbeiten von NEUHOFF und HARRIS (37) und NEUHOFF und KÖHLER (38) geben Auskunft über Ausscheidungsprodukte des 3-Ap im Urin von Ratten. Die Autoren fanden N-methylierte, N-oxydierte und glukuronidierte Derivate des 3-Ap und des Py-3-MeC. Offenbar handelt es sich um Entgiftungsprodukte, die für den weiteren Abbau zu Ns keine Rolle spielen, mit Ausnahme des N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon und N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon, die wahrscheinlich durch Oxydation und Amidierung primär entstandener Ns gebildet werden. Entsprechend den Messungen von NEUHOFF entfallen 1 - 2 % der eingesetzten Radioaktivität auf diese Metaboliten. Als ein Hauptabbauprodukt des 3-Ap isolierten NEUHOFF und HARRIS (37) das 3-Acetyl-6-pyridon (3-Ac-6-Py). In dieser Substanz fanden sie 25 % der Aktivität des applizierten 3-Ap wieder.

Von den in Abb.1 aufgeführten Substanzen sind bisher Py-3-MeC und Diol isoliert und identifiziert worden. Indirekt trifft dies auch für Ns zu, denn das von BEHER (1) gefundene NM-NA entsteht aus primär gebildeter

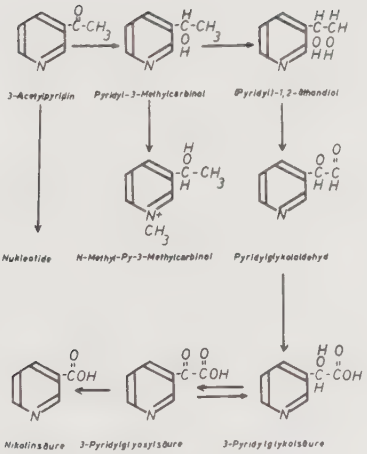


Abb.1 Schema von McKennis über den Abbau des 3-Ap

Ns (32). Es ist bisher nicht bekannt, auf welche Weise diese Stoffe entstehen. Nur der erste Schritt im Schema von 3-Ap zur Py-3-MeC wurde in vivo und in vitro untersucht. ÖSTERLE (41) wies nach, daß er in Gegenwart einer kern- und mitochondrienfreien Präparation von Lebergewebszellen abläuft und daß die Reaktion durch Isozitronensäuredehydrogenase katalysiert werden kann.

Auf Grund der mitgeteilten Befunde dürfen für den Stoffwechsel von 3-Ap zwei wesentliche Abbauwege angenommen werden. In beiden Fällen handelt es sich um oxydative Prozesse. Einmal führt die Oxydation und Dekarboxylierung der Seitenkette zu Ns und NA, zum anderen wird durch Oxydation am Ring ein Pyridonderivat des 3-Ap gebildet. Der Mechanismus beider Abbauwege ist unbekannt. Ebenso bleibt die Frage offen, ob Py-3-MeC und Diol tatsächlich Zwischenprodukte auf dem Wege von 3-Ap zu Ns darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, über welche Zwischenstufen die Oxydation am Ring und an der Seitenkette verläuft, ob die von McKENNIS (35) angegebenen Intermediärprodukte isoliert werden können, wenn 3-Ap und Py-3-MeC in vivo und in vitro inkubiert werden und ob die Zwischenprodukte selbst in Gegenwart von Gewebshomogenat zu Ns abgebaut werden.

M e t h o d e n

I. Substanzen

a) Nikotinsäure (Ns) und Nikotinsäureamid (NA) wurden von der Firma E.Merck AG, Darmstadt, 3-Acetylpyridin (3-Ap) von der Firma Chemische Fabrik Dr.F.Raschig, Ludwigshafen, bezogen (Strukturformel von 3-Ap s.Abb.1, UV-Spektrum von 3-Ap s. Abb.2).

b) Für die Untersuchungen in vivo und in vitro standen eine Reihe von KORANSKY und MÜNCH synthetisierter Substanzen zur Verfügung. Teilweise handelt es sich um Stoffe, die McKENNIS (35) als Intermediärprodukte des Abbaues von 3-Ap zu Ns ansieht. Insoweit können die Strukturformeln der Abb. 1 entnommen werden. Die UV-Absorptionsspektren der Substanzen sind in den Abb. 2, 3 und 4 wiedergegeben:

1. Pyridyl-3-Methylcarbinol (Py-3-MeC)

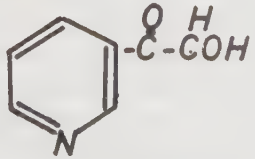
   FP des Hydrochlorids = 91°C, spezifische Extinktion[1)] des Methyljodids in 0,1 n HCl $\varepsilon_{264,5\ m/u}$ = 5120

2. (3-Pyridyl)-1,2-äthandiol (Diol)

   FP = 90 - 95°C, spezifische Extinktion des Methyljodids in 0,1 n HCl $\varepsilon_{264,5\ m/u}$ = 4860

3. ω-Oxyacetylpyridin (Ketol)

   FP = 103-105°C



1) Spezifische Extinktion ε der Extinktion des Stoffes bei Schichtdicke 1 cm und Konzentration 1 · 10 -3 M/ml

4. Pyridyl-3-glykolsäure (Glykol-S)

FP = 150 - 154°C, spezifische Extinktion
in 0,1 n HCl $\varepsilon_{261\ m\mu}$ = 5120

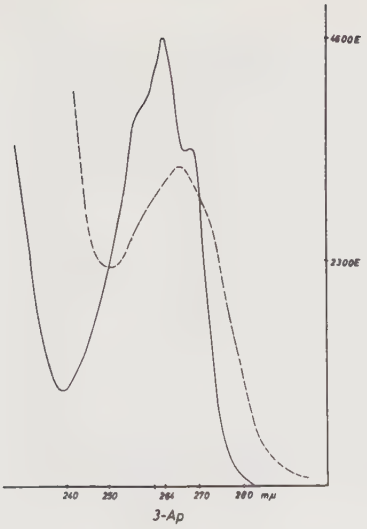
5. Pyridyl-3-glyoxylsäure (Glyoxyl-S)

FP = 178 - 180°C, spezifische Extinktion
in 0,1 n HCl $\varepsilon_{259,5\ m\mu}$ = 4535

6. 3-Acetyl-6-Pyridon (3-Ac-6-Py)
(Spektrum s. Abb. 12)
FP = 187 - 188°C, spezifische Extinktion
in 0,1 n HCl $\varepsilon_{275\ m\mu}$ = 12 900

7. N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon (NM-3-Ac-6-Py)
(Spektrum s. Abb. 11b)
FP = 149 - 151°C, spezifische Extinktion
in 0,1 n HCl $\varepsilon_{277\ m\mu}$ = 9300 und
$\varepsilon_{285\ m\mu}$ = 8550

c) Die radioaktiven Substanzen 3-Ap, Py-3-MeC, Diol und Glyoxyl-S waren ubiquitär mit Tritium (^3H) markiert. Die Markierung wurde von KORANSKY teils im Pharmakologischen Institut, FU, teils bei der Firma Schering AG, Berlin, nach dem Verfahren von EIDINOFF durchgeführt. Die Reinheit der radioaktiven Substanzen wurde von KORANSKY je nach ihren Eigenschaften durch folgende Untersuchungen gesichert: Gaschromatographie an verschiedenen stationären Phasen, Dünnschichtchromatographie in mindestens drei verschiedenen Systemen, FP oder KP Bestimmung sowie Darstellung der N-methylierten Derivate und deren Prüfung durch die obengenannten Verfahren. Die gefundenen Werte stimmten mit den theoretischen und in der Literatur angegebenen überein.



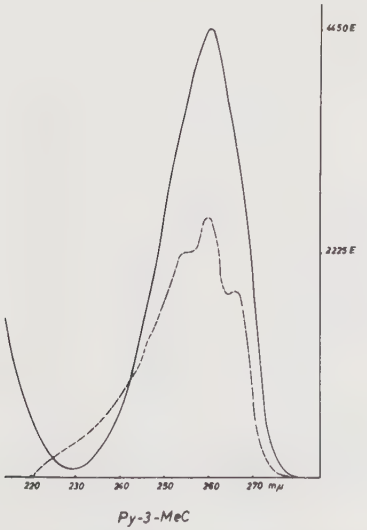


Abb. 2: UV-Spektren von 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-Methylcarbinol

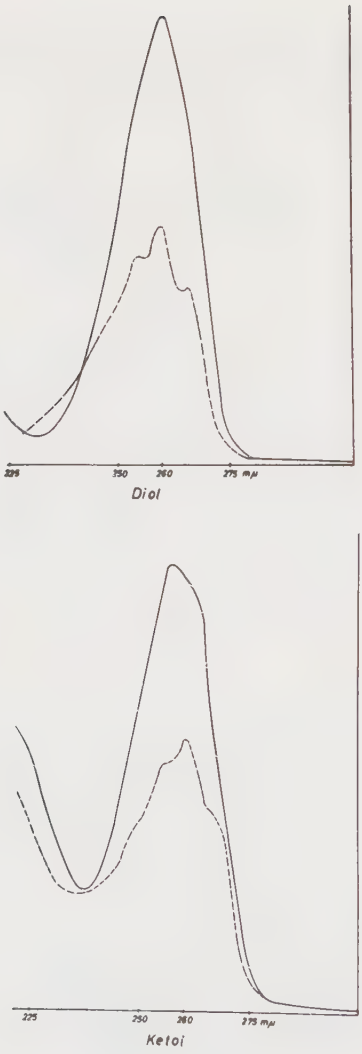
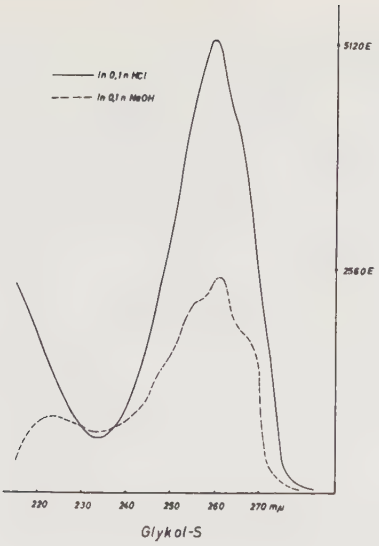
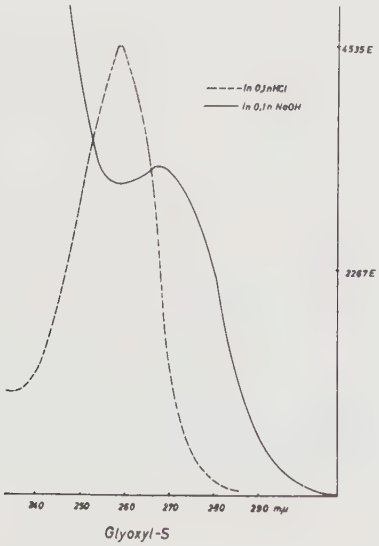


Abb. 3: UV-Spektrum von (3-Pyridyl)- 1,2-äthandiol und ω -Oxyacetylpyridin



Glykol-S



Glyoxyl-S

Abb. 4: UV-Spektren von Pyridyl-3-glykolsäure und Pyridyl-3-glyoxylsäure

II. Darstellung der Methyljodide

Pyridinverbindungen lassen sich allgemein nur mit Schwierigkeiten aus Lösungen kristallin abscheiden. Deshalb werden sie für die Isotopenverdünnungsanalyse in die Methjodide (-MJ) überführt. Man erhält sie, wenn die Pyridinderivate in siedendem Methanol gelöst 3 Stunden mit einem Überschuß von Methyljodid am Rückfluß behandelt werden. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert. Die Kristallisation wird gefördert, wenn der Rückstand in Butanol aufgenommen und nochmals zur Trockne eingeengt wird. Die erhaltenen Methjodide kristallisieren aus kaltem Isopropanol, Propanol, Äthanol oder Methanol.

III. Darstellung des Nikotinsäuremethylesters (NsMeE)

Nikotinsäure bildet kein Methjodid, solange sie anionisch dissozieren kann. Um dies zu verhindern, wird Ns mit Methanol verestert. Dazu werden 100 mg Ns in 100 ml Methanol gelöst und 2 Stunden am Rückfluß gekocht. Während dieser Zeit wird Chlorwasserstoffgas eingeleitet. Anschließend wird der Methylalkohol abgedampft. Der Rückstand löst sich in 5 ml H_2O. Man überschichtet mit 10 ml Äther und gibt Natriumkarbonat dazu, bis bei einem pH von 7,0 der Ester in Form der freien Base vorliegt. Dann wird mit 2 x 10 ml Äther extrahiert. Die ätherische Lösung trocknet man mit $Na_2 SO_4$, filtriert, dampft den Äther ab und erhält einen weißen, kristallinen Rückstand von NsMeE. Behandelt man den Ester in der obenangegebenen Weise mit Methyljodid, so entsteht Nikotinsäuremethylestermethjodid (NsMeEMJ). Die Verbindung hat einen FP von 129°C.

IV. Cofermente

1. NADP-H regenerierendes System

Die Versuche in vitro wurden teilweise in Gegenwart eines NADP-H regenerierenden Systems durchgeführt. Dazu wurden in den Versuchsansatz mit 5 ml Volumen eingewogen:

NADP-Na	1,5 mg	≙	1,96 µ Mol
Glukose-6-phosphat	4,8 mg	≙	18,5 µ Mol
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	3,8 mg	≙	12,2 µ Mol
NA	10,0 mg	≙	82,0 µ Mol
Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (Fa. Boehringer)	0,02 ml		

NA wurde zugesetzt, um den Abbau des NADP zu hemmen.

2. Darstellung von Tetrahydrofolsäure

Folsäure wurde nach der Methode von FUTTERMANN (16) in Dihydrofolsäure überführt. Dazu behandelt man Folsäure in wässriger, alkalischer Lösung mit Ascorbinsäure, Na-Ascorbat und $Na_2S_2O_4$. Die entstandene Dihydrofolsäure wird anschließend bei 0^oC unter Zugabe von 2 n HCl gefällt und abzentrifugiert. Die weitere Hydrierung zu Tetrahydrofolsäure erfolgte in Gegenwart von NADP-H und Folsäurereduktase. Letztere erhält man nach MATHEWS, SCRIMGEOUR und HUENNEKENS (33) aus Rattengehirn. Ich danke Herrn Dr. TIMMLER, früher Mitarbeiter von Professor HERKEN, der mir das Enzym zur Verfügung stellte. Die Bildung der Tetrahydrofolsäure kann man am Spektrophotometer durch die Verschiebung des Extinktionsmaximums von 283 nach 295 mµ verfolgen.

3. Thiaminpyrophosphat

Die Substanz wurde in Form des Handelspräparates Berolase verwendet. Zur Prüfung wurde der Phosphorsäuregehalt ermittelt, der mit 2,2 /u Mol pro /u Mol Thiaminpyrophosphat mit dem theoretischen Wert übereinstimmt.

4. Pyridoxalphosphat

Pyridoxalphosphat wurde als Pyridoxal-5-phosphorsäureester von der Firma E. Merck bezogen.

V. Tierversuche

a) Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200 g $\pm$ 10 %. Die Tiere wurden mit einem standardisierten Preßfutter und Leitungswasser ernährt.

b) Präparation von Leber- und Nierengewebe

1. Leberzellhomogenat von 200 g schweren Ratten wurde nach dem Verfahren von POTTER und ELVEHJEM hergestellt. Dabei wurde 1g Leber in 4 ml isotonem Inkubationsmedium homogenisiert. Dieses setzte sich folgendermaßen zusammen:

1,15 %-ige wässrige KCl-Lösung	77 ml
5,5 %-ige wässrige Glukose-Lösung	3 ml
0,066 m Phosphatpuffer pH 7,4 (Sörensen)	20 ml

2. Supernatant (kern- und mitochondrienfreies Plasma) erhält man, wenn Leberzellhomogenat bei 0°C 10 Min. mit 10^4 x g zentrifugiert wird.

3. Leber- und Nierenschnitte werden nach der von UMBREIT und STAUFFER (45) veröffentlichten Methode mit dem Rasiermesser angefertigt.

4. Präparation einer Zellfraktion aus Kaninchen- bzw. Rattenleber, die Aldehydoxydase enthält

Die Darstellung des Enzyms erfolgte in Abwandlung der von HANDLER (19) angegebenen Methode. Wir verzichteten auf die Reindarstellung und beschränkten uns darauf, eine Zellfraktion zu isolieren, in der Aldehydoxydaseaktivität enthalten ist. Ein Teil Leber von Kaninchen oder Ratten plus fünf Teile eiskaltes Wasser werden dazu in dem Gerät nach POTTER und ELVEHJEM homogenisiert. Der Gewebsbrei wird 10 Min. bei 10^4 x g zentrifugiert. Die Fetthaut wird abgesaugt. Der Überstand wird dekantiert. Durch Zentrifugieren bei 10^5 x g werden daraus alle korpuskulären Bestandteile einschließlich der Mikrosomen abgetrennt. Die Aldehydoxydase ist im Überstand enthalten.
Um zu prüfen, ob der so gewonnene Überstand tatsächlich Aldehydoxydaseaktivität enthält, wurde die von KNOX (31) beschriebene Oxydation des N-Methylnikotinamid (NM-NA) zu seinem 6-Pyridon durchgeführt.
Im Ansatz waren enthalten:

3 ml einer $2 \cdot 10^{-4}$ M NM-NA-Lösung
in 0,05 M Phosphatpuffer von pH 7,4
dazu 0,1, 0,2 oder 0,3 ml Enzymlösung.

Die Reaktion wurde in Küvetten im Photometer durchgeführt, so daß nach Zugabe des Enzyms der Anstieg der Extinktion im Ansatz gegenüber einem Leerwert, der 3,0 ml 0,5 M Phosphatpuffer von pH 7,4 und 0,1 ml der Enzymlösung enthielt, aufgezeichnet werden konnte. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 280 mμ. An dieser Stelle des Spektrums liegt das Maximum der

Extinktionsdifferenz zwischen NM-NA-6-Pyridon und NM-NA, das bei dieser Wellenlänge keine UV-Absorption besitzt.

Ergebnis: Nach Zugabe der Enzymlösung aus Kaninchenleber zum Ansatz steigt die Extinktion gradlinig an. Der tg α beträgt für 0,1 ml Enzymlösung 0,2126, für 0,2 ml 0,2679 und für 0,3 ml 0,3640. In Gegenwart von Aldehydoxydase aus Rattenleber erfolgte kein Extinktionsanstieg.

Die Identifizierung des Reaktionsproduktes erfolgte durch die Aufzeichnung seines UV-Absorptionsspektrums. Dazu wurden die Ansätze nach Stillstand der Reaktion mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Das organische Lösungsmittel wurde abgedampft und anschließend der Rückstand in 3,0 ml 0,1 n HCl gelöst. Die Spektren der Substanz, die aus NM-NA entstanden war, zeigten folgende Charakteristika:

	Min.	Max.	Max.
sr.	244	256,5	299
alk.	241,5	256,5	293,5
neutr.	-	264	-

(Zahlen ≙ Wellenlänge in m/u)

Diese Werte stimmen mit denen überein, die PULLMANN und COLOWICK (42) für das 6-Pyridon des N-Methyl-NA angeben. Aus der Identität der UV-Absorptionsspektren darf unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der im Testansatz gebildete Stoff aus N-Methyl-NA entstanden ist, angenommen werden, daß es sich um N-Methyl-NA-6-Py handelt. Die Präparation aus Kaninchenleber erhält somit aktive Aldehydoxydase.

In der für N-Methyl-NA beschriebenen Weise wurden N-M-3-Ap und 3-Ap in Versuche mit Aldehydoxydase eingesetzt.

VI. Isolierung, Identifizierung und quantitative Bestimmung der Metaboliten

a. Dünnschichtchromatographie (DC): Zur chromatographischen Trennung von Pyridinabkömmlingen ist die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel eine geeignete Methode. Kieselgel HF nach Stahl mit Leuchtpigment von der Fa. E.Merck, Darmstadt, wurde mittels Spezialbeschichter auf Glasplatten von 20 x 20 cm so aufgetragen, daß die Schichtdicke 500 µ betrug. Die Platten wurden 24 Stunden an der Luft getrocknet und waren dann gebrauchsfertig. Die Chromatographie wurde teilweise in der "feuchten Kammer" und teilweise nach der "Sandwich-Methode" durchgeführt. Die Trennstrecke betrug 16 cm. Bei 18 cm breitem Auftragsort erhält man noch scharfe Trennungen, wenn die Platten mit 12 mg Substanz oder wässrigem Gewebshomogenat, das 0,5 g Leber enthält, belastet werden.

Folgende Fließmittel (Flm.) erwiesen sich als geeignet zur Trennung von 3-Ap, Py-3-MeC, 3-Ac-6-Py, NM-3-Ac-6-Py, Ns und NA :

Flm. I[+] : Benzol - Methanol - Chloroform - Eisessig
70 : 20 : 5 : 5 [++]
(Scharfe Trennung von NA und Py-3-MeC erst nach Rechromatographie, Lage der Substanzen s. Abb. 5)

Flm. II : Chloroform - Äthanol
90 : 70
(Keine Trennung von Py-3-MeC und 3-Ac-6-Py)

Flm. III : Isopropanol - 5 % Ammoniak
95 : 70

+) modifiziert nach GÄNSHIRT und MALZACHER (17)
++) Volumenteile im Gemisch

Flm. IV : Butanol - Äthanol - H_2O - Konz.Ammoniak
4 : 1 : 1 : 1

Flm. V : Methyläthylketon

Flm. VI : Essigsäureester - Methanol
95 : 5

Flm. VII : H_2O - Methanol
90 : 10
(Trennung von 3-Ac-6-Py und NM-3-Ac-6-Py s.Abb. 12)

Flm. VIII : n-Butanol - Methanol - H_2O - Aceton -
21 : 21 : 27 : 15 :
Eisessig - Konz.Ammoniak
9 : 3
(Isolierung von NM-3-Ap)

Das Flm. I kann zur DC nur in der"feuchten Kammer " benutzt werden. Arbeitet man nach der "Sandwich-Methode" so finden sich von ein und derselben Substanz an zwei, oft an drei Stellen Flecken im DC. Für diesen unerwünschten Effekt scheint eine Entmischung des Flm. verantwortlich zu sein. Diese Beobachtung machte auch ÖSTERLE (41). Da die Lage der Substanzen bei DC im Verhältnis zur Front trotz des Bemühens um konstante Bedingungen etwas variiert, wurden die gesuchten Verbindungen durch die gleichzeitig chromatographierten Reinsubstanzen identifiziert.

An dieser Stelle sei auf die methodische Schwierigkeit hingewiesen, die sich aus der Tatsache ergibt, daß bei

der Elution der Substanzen vom Kieselgel mit 0,1 n HCl eine geringe Menge des Kieselgels in Lösung geht. Kieselgel selbst besitzt eine uncharakteristische UV-Absorption, die zwischen 300 und 220 m/u kontinuierlich ansteigt. Die daraus resultierende Extinktion addiert sich zu der der gesuchten Pyridinverbindungen und verzerrt deren Spektren. Quantitative Bestimmungen sind nur möglich, wenn jedesmal gegen einen Leerwert gemessen wird, den man erhält, wenn zur Chromatographie nur die halbe Plattenseite benutzt wird. Aus der freien Hälfte entnimmt man als Leerwert in Höhe der zu messenden Bande einen flächengleichen Teil der Kieselgelschicht. Man umgeht dieses umständliche Verfahren, wenn man das Kieselgel zuerst mit 0,1 n NaOH eluiert und das Eluat nachträglich ansäuert. Bei alkalischer Reaktion geht Kieselgel nicht in störender Menge in das Eluat.

b. Spektrophotometer: Die Messung der UV-Absorption erfolgte mit Beckmann-Geräten (Modelle DB, DU und DK-2).

c. Radiochromatogramme (RD): Die Radiochromatogramme wurden mit einem Gerät der Firma Berthold geschrieben. Diese Apparatur erlaubt es, die DC-Platten mit variabler Geschwindigkeit an einem Gasflußzählrohr vorbeizutransportieren. Das Gerät ist mit einem Schreiber synchron gekoppelt.

d. Gaschromatographie: Die Retentionszeiten der Pyridinverbindungen wurden im Gasfraktometer E 116 der Firma Perkin-Elmer bestimmt. Dazu wurden die Substanzen in methanolischer Lösung eingespritzt. Als Trägergas diente Helium. Das Gerät war so eingerichtet, daß

nach Passieren der Trennsäule das Trägergas mit der gesuchten Substanz in Methanol eingeleitet werden konnte.
Zur Identifizierung von Begleitstoffen in käuflichem 3-Ap wurde mit der C-Säule bei 180°C und 1,5 atü. gearbeitet.

e. Kontaktphotographie: Photopapier wurde auf der Rückseite von DC-Platten befestigt und die Platte 1 - 1,5 Minuten lang mit UV-Licht von 254 mμ Wellenlänge belichtet. Die Lichtquelle war 25 cm von der Platte entfernt.

f. Quantitative Bestimmung der Radioaktivität:
Die Radioaktivität wurde im Packard-Tri-carb (liquid scintillation counting system), Modell 314, gemessen und als Impulse pro Minute (Ipm) angegeben. Um daraus die Zahl der Zerfälle pro Minute (Zpm) zu erhalten, wurde die Zählausbeute bei jeder Messung mit Hilfe eines internen Standards ermittelt.

g. Isotopenverdünnungsanalyse: Dieses Verfahren wurde angewendet, weil radioaktive Substanzen identifiziert und quantitativ bestimmt werden sollten, die in zu geringer Menge vorlagen, um sie direkt aus Lösungen kristallin abzuscheiden. Man gibt deshalb zu der Lösung den gesuchten Stoff in seiner inaktiven Form in einer Menge, der gegenüber die Menge an radioaktiver Substanz vernachlässigt werden kann. Wenn sich nach einer Reihe von Kristallisationsschritten in einem aliquoten Teil der Mutterlauge ein konstanter Wert für die spezifische Aktivität (molare Radioaktivität) ergibt, ist die radioaktive Substanz als der Stoff identifiziert, der zur Isotpenverdünnungsanalyse in

inaktiver Form zugegeben wurde, denn die Verluste, denen eine Substanz im Zuge des Kristallisierens unterliegt, sind für aktive und inaktive Form desselben Stoffes gleich groß. Das Verfahren gestattet auch die quantitative Bestimmung des radioaktiven Metaboliten für den Fall, daß aus einem Molekül der Substanz A ein Molekül der Substanz B ohne Verlust an Radioaktivität entsteht. Aus der spezifischen Aktivität, die nach Kristallisation gefunden wurde, und der Verdünnung durch die zugefügte inaktive Substanz erhält man die Menge an Radioaktivität, die den gesuchten Metaboliten zugehört. Die Formel, nach der die Berechnung erfolgt, ist S. 45 angegeben.

Ergebnisse

A. Reinigung von käuflichem 3-Ap und Identifizierung der Begleitstoffe

In der Einleitung wurde auseinandergesetzt, daß es bisher noch nicht gelungen ist, durch Inkubation von 3-Ap mit Leberhomogenat Ns zu erhalten. In den ersten Untersuchungen dieser Arbeit wurde deshalb versucht, ob nach Inkubation von 3-Ap mit einem kern- und mitochondrienfreien Homogenat aus Rattenleber Ns nachgewiesen werden kann. Aus den Ansätzen sollte eventuell entstandene Ns mittels DC isoliert werden. Zunächst wurde käufliches 3-Ap von der Fa. Raschig als Substrat eingesetzt. Das Ergebnis dieses Versuches veranschaulicht die Skizze des DC (Abb. 5a). Daraus ist zu ersehen, daß eine Substanz abgetrennt wird, die in Höhe der als Vergleichsstoff eingesetzten authentischen Ns liegt. Dabei handelt es sich tatsächlich um Ns, wie aus der Übereinstimmung der UV-Spektren und der Rf-Werte in versch-iedenen Flm. hervorgeht.

Als dieser Versuch mit tritiumsigniertem 3-Ap wiederholt wurde, fand sich an der Stelle des Chromatogramms, wo Ns zu erwarten wäre (Abb. 5b), kein entsprechender Fleck. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden radioaktives und käufliches 3-Ap chromatographisch auf Reinheit untersucht. Die DC in Flm. I ergab, daß tritiertes 3-Ap einheitlich war, während sich aus dem käuflichen Präparat drei Flecke abtrennten. Bei dem Flecken mit der stärksten UV-Absorption und dem Rf-Wert von 0,42 handelte es sich um 3-Ap, wie der dünnschichtchromatographische Vergleich in den Flm. I und Flm. II und das UV- Spektrum zeigten.

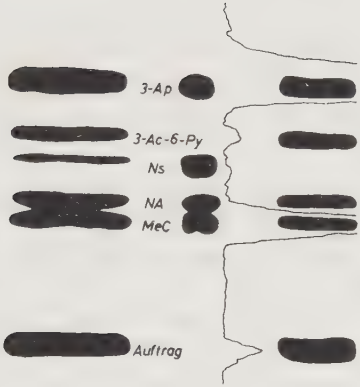


Abb.5a Abb.5b

Abb.5a: DC eines Ansatzes mit käuflichem 3-Ap
Abb.5b: DC eines Ansatzes mit radioaktivem 3-Ap

Die beiden Verunreinigungen wurden V_1 und V_2 genannt. Bei DC in Flm. I hat V_1 einen Rf-Wert von 0,59 und V_2 von 0,48 (Abb. 7a). Die unbekannten Begleitstoffe V_1 und V_2 besitzen ein Ns-Spektrum (Abb. 6), ohne daß es sich um Ns handelt, die im Chromatogramm an ganz anderer Stelle läuft. Da die Möglichkeit bestand, daß die aus Ansätzen mit käuflichem 3-Ap isolierte Ns aus den Verunreinigungen gebildet wurde, schien es wichtig, die chemische Struktur dieser Stoffe zu untersuchen.

Um V_1 und V_2 in größerer Menge zu erhalten, wurde käufliches 3-Ap im Wasserbad von 90°C erhitzt und bei einem Druck von 3 - 5 Torr der fraktionierten Destillation unterworfen. Die bei 48,5, 50, 51 und 51 - 55°C überdestillierenden Fraktionen wurden in vier Vorlagen aufgefangen. Nach Abschluß der Destillation verblieb ein dunkelbrauner visköser Rückstand im Destillationskolben.

Von den fünf Portionen wurden Proben in Flm. I chromatographiert. 3-Ap und V_2 fanden sich in allen Fraktionen, V_1 war dagegen nur im Rückstand enthalten. Die völlige Isolierung der Begleitstoffe durch Destillation gelingt offenbar nicht, jedoch ist auf diesem Wege eine Anreicherung möglich.

Inzwischen teilte die Fa. Raschig auf Anfrage mit, daß zur Herstellung von 3-Ap Nikotinsäurebutylester verwendet wird und daß bei dem Verfahren neben 3-Ap eine geringe Menge 2-Ap entstehen könnte. Diese Verunreinigungen werden bei der technischen Darstellung durch fraktionierte Destillation abgetrennt. Die Firma stellte eine Reihe von Destillationsproben zur Verfügung, in denen V_1 und V_2 angereichert waren.

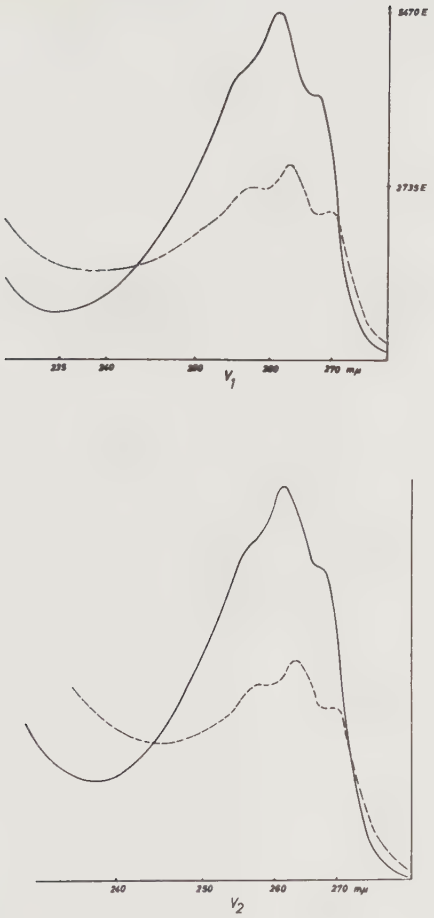


Abb. 6: UV-Spektren der Verunreinigungen, die in käuflichem 3-Acetylpyridin vorhanden sind

Abb. 7b

Abb 7a

a) dünnschichtchromatographische Reinigung von 3-Ap

b) Retentionszeiten bei Gaschromatographie I NaBuE

II V_1 und III V_2

Zunächst wurde daran gedacht, daß eine der Verunreinigungen 2-Ap sein könnte, das bei der Herstellung in geringer Menge neben 3-Ap entstehen soll. Diese Substanz scheidet jedoch aus der Betrachtung aus, denn sie besitzt kein Ns-Spektrum.

Um V_1 und V_2 mit Nikotinsäurebutylester (NsBuE) vergleichen zu können, wurde dieser Ester nach der gleichen Methode wie der Methylester dargestellt (s. Methoden Punkt III).

Das Reaktionsprodukt war im DC und Gaschromatogramm einheitlich. NsBuE ist eine ölige Substanz, besitzt ein Ns-Spektrum und hat in 0,1 n HCl bei 261 m/u eine spezifische Extinktion von 5470.

Zunächst wurde das dünnschichtchromatographische Verhalten des NsBuE mit dem von V_1 und V_2 in Flm. I und Flm. II verglichen. Da bei der DC die Rf-Werte nie ganz konstant sind (s. Methodik VI, a), wurden für die Substanzen der R_{3-Ap}-Wert angegeben; d.h. das Verhältnis der Lage der Substanzen zum 3-Ap (Tab. 1).

	Flm. I	Flm. II
NsBuE	1,21	1,19
V_1	1,20 - 1,21	1,18 - 1,20
V_2	1,12 - 1,13	1,16

Tab. 1: R_{3-Ap}-Werte für NsBuE, V_1, V_2 bei DC in Flm. I und Flm. II.

Die R_{3-Ap}-Werte von NsBuE und V_1 stimmen überein, während V_2 in beiden Flm. einen deutlich verschiedenen Wert aufweist.

Um weitere Vergleichswerte des physiko-chemischen Verhaltens zu gewinnen, wurden im Gaschromatographen die Retentionszeiten von V_1, V_2 und NsBuE ermittelt (Arbeitsbedingungen s. Methodik VI, d).

Die Retentionszeiten betrugen:

V_1	24,5 Min.
NsBuE	24,5 Min.
V_2	25,5 Min.

Im gaschromatischen Verhalten stimmen V_1 und NsBuE ebenfalls überein (s. Abb. 7 b).

Um zu belegen, daß die Ns in den beschriebenen Versuchen mit käuflichem 3-Ap tatsächlich aus den Verunreinigungen entstanden ist, wurden V_1, V_2 und synthetischer NsBuE mit kern- und mitochondrienfreiem Homogenat aus Rattenleber inkubiert. Wenn aus NsBuE Ns entsteht, so handelt es sich dabei um die Hydrolyse eines Esters. Falls aus V_1 Ns gebildet wird und diese Reaktion in Gegenwart eines Esterasehemmers unterdrückt wird, wäre das ein Hinweis darauf, daß die Ns durch Esterspaltung entstanden ist. Deshalb wurde den Ansätzen Mintakol (E 600) in Konzentrationen, die die Esterasen hemmen, zugesetzt. Die Ansätze enthielten bei einem Volumen von 1,2 ml 0,87 mg V_1 bzw. 0,5 mg NsBuE und 0,15 ml Supernatant. Sie wurden 1 Std. bei 37°C inkubiert.

Mintakol	V_1	Ns	NsBuE	Ns
./.	0,87 mg	0,25 mg	0,5 mg	(0,14 mg)
10^{-6}M	0,87 mg	./.	0,5 mg	./.
10^{-7}M	0,87 mg	0,05 mg	0,5 mg	0,03 mg
10^{-8}M	0,87 mg	0,23 mg	0,5 mg	0,44 mg

Tab. 2: Ergebnisse der biologischen Versuche mit V_1 und NsBuE. Es sind die im Ansatz vorhandene Konzentration des Mintakol, die eingesetzte Menge von V_1 bzw. NsBuE und die Menge der jeweils isolierten Ns angegeben.

Die Werte für Ns in Tab. 2 zeigen, daß aus V_1 und NsBuE Ns entsteht und daß durch steigende Konzentration von Mintakol die Bildung von Ns gehemmt bzw. völlig unterdrückt werden kann.

Entsprechende Versuche mit der V_2 genannten Verunreinigung zeigten, daß auch aus dieser Substanz Ns entsteht.

Aus den Versuchen ergibt sich: Käufliches 3-Ap enthält zwei Begleitstoffe, von denen einer - mit V_1 bezeichnet - durch Vergleich der UV-Spektren, der $R_{3\text{-Ap}}$-Werte in verschiedenen Flm. sowie der Retentionszeit im Gaschromatographen als NsBuE identifiziert wurde. Die Struktur der zweiten Verunreinigung V_2 wurde nicht ermittelt.

Nach Inkubation mit Leberhomogenat entsteht aus beiden Stoffen Ns. Im Falle von V_1 ist die Bildung von Ns durch Mintakol hemmbar. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, daß die Ns durch Spaltung einer Esterbindung entsteht.

Diese Befunde vermögen vielleicht die Beobachtung von TISCHER (44) zu erklären, der bei seinen Experimenten im Gegensatz zum Ergebnis dieser Versuche bei der Inkubation von 3-Ap immer Ns fand. Er konnte die Bildung von Ns durch Zusatz von E 600 hemmen. Es ist anzunehmen, daß diese Ns nicht aus 3-Ap, sondern aus der Verunreinigung NsBuE entstanden ist. Offenbar verläuft die Esterspaltung rasch, denn bereits nach fünf Minuten kann man eine Menge Ns isolieren, die der Hälfte dessen entspricht, was nach einer Stunde gebildet worden ist.

Da die schnell entstandene Ns aus Ns-Verbindungen gebildet wird, die als Begleitstoffe im käuflichen 3-Ap vorkommen, wurden die weiteren Untersuchungen nur mit chromatographisch gereinigtem 3-Ap durchgeführt.

B. Untersuchungen über den Abbau von 3-Ap und Py-3-MeC in vivo

Der Abbau des 3-Ap zu Ns soll nach McKENNIS (35) über eine Reihe von Zwischenstufen verlaufen. Als solche kommen die Substanzen Py-3-MeC und Diol in Betracht, die im Urin nachgewiesen wurden. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde geprüft, ob 3-Ap, Py-3-MeC, Diol, Ketol, Ns und NA aus Organen von Ratten isoliert werden können, wenn man den Tieren radioaktives 3-Ap oder Py-3-MeC appliziert. Um die gesuchten Stoffe als Metaboliten der Ausgangssubstanzen identifizieren zu können und um sie möglicherweise quantitativ zu erfassen, wurden in den Organextrakten mit den obengenannten Verbindungen Isotopenverdünnungsanalysen durchgeführt.

I. Isolierung von radioaktivem 3-Ap, Py-3-MeC, NA und Ns aus ganzen Ratten nach Gabe von tritiiertem 3-Ap

Drei männlichen Ratten wurden insgesamt 23,75 mg radioaktives 3-Ap (Aktivität 1,4 mC, spezifische Aktivität 7,2 $\mu C/\mu Mol$) intraperitoneal appliziert. Nach fünf Stunden zeigten die Tiere deutliche Vergiftungssymptome, d.h. sie liefen mit gesträubtem Haar ataktisch umher oder lagen mit ausgestreckten Pfoten in einer Ecke des Käfigs. Die Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt durch Dekapitieren getötet. Der abgetrennte Schädel, das Blut und der übrige Kadaver wurden in flüssiger Luft eingefroren und in einem Metallmörser unter Kühlung mit flüssiger Luft in erbsgroße Stücke zerschlagen. Die Gewebetrümmer wurden im Starmix (Industrieausführung) mit dem dreifachen Volumen 1 n $HClO_4$ homogenisiert. Es gelang auf diese Weise

aus allen Gewebebestandteilen mit Ausnahme der Haare und Sehnen, die abgesiebt wurden, eine Suspension herzustellen. Das Homogenat wurde in vier Portionen geteilt, und die zur Isotopenverdünnungsanalyse erforderliche Menge der zu testenden Substanzen wurde in den einzelnen Portionen gelöst.

Folgende Gemische wurden hergestellt:

I.	400 ml Homogenat u. 300 mg Ns	(2,44 mMol)
II.	400 ml Homogenat u. 300 mg NA	(2,46 mMol)
III.	100 ml Homogenat u. 317,6 mg 3-Ap	(2,49 mMol)
IV.	100 ml Homogenat u. 329,7 mg Py-3-MeC	(2,66 mMol)

Anschließend wurde die Gewebesuspension zentrifugiert, der Überstand mit KOH auf pH 1 eingestellt und ausgefallenes $KClO_4$ durch neuerliches Zentrifugieren abgetrennt. Die klarfiltrierten Überstände wurden lyophilisiert.

Isolierung von 3-Ap und Py-3-MeC

Der weißliche, spongiöse Rückstand der 3-Ap und Py-3-MeC enthaltenden Fraktionen löste sich in je 25 ml Aqua dest. Mit KOH wurden die noch immer stark sauren Lösungen auf pH 1,5 eingestellt. Ausgefallenes $KClO_4$ wurde abzentrifugiert.

Der klare, sauer reagierende Überstand wurde mit dem doppelten Volumen Dichlormethan ausgeschüttelt, um Verunreinigungen abzutrennen. Anschließend wurde die wässrige Lösung auf pH 14 eingestellt und erneut mit Dichlormethan extrahiert, um die Pyridine, die bei alkalischer Reaktion unpolare Verbindungen sind, in das organische Lösungsmittel zu überführen. Der Methylenchloridextrakt wurde durch Zugabe von Na_2SO_4 getrocknet.

Um 3-Ap und Py-3-MeC aus den Extrakten kristallin abscheiden zu können, wurden beide Substanzen in die Methyljodide überführt (s.Methoden Punkt II). Anschließend wurde das Dichlormethan abgedampft. Es blieb ein gelblicher Niederschlag zurück. Mit diesem wurden die Umfällungen für die Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt. Die Werte der spezifischen Aktivität, die für 3-Ap-MJ gefunden wurden, sind in Tab. 3 und diejenigen für Py-3-MeC-MJ in Tab. 4 zusammengestellt. Der Mittelwert der letzten fünf Kristallisationsschritte ergibt für wiedergefundenes 3-Ap eine spezifische Aktivität von 12,4 n C/µMol. Für das isolierte Py-3-MeC beträgt die spezifische Aktivität - aus den letzten drei Werten berechnet - 29,3 n C/µMol.

Kristallisation	3-Ap-MJ (/uMol)	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nC/uMol)
1.	$1{,}55 \cdot 10^{-1}$	1325,0	1658,0	13,93	26,6
2.	$4{,}06 \cdot 10^{-2}$	291,0	611,0	13,40	19,9
3.	$2{,}78 \cdot 10^{-2}$	179,0	455,0	11,54	19,0
4.	$2{,}36 \cdot 10^{-2}$	180,9	500,5	13,35	18,6
5.	$4{,}39 \cdot 10^{-2}$	170,7	417,0	10,30	12,5
6.	$3{,}43 \cdot 10^{-2}$	186,0	487,4	12,60	14,6
7.	$4{,}94 \cdot 10^{-2}$	193,0	472,6	11,68	11,4
8.	$3{,}40 \cdot 10^{-1}$	1162,0	1498,0	14,10	10,6
9.	$3{,}60 \cdot 10^{-1}$	1300,0	1589,0	12,10	13,1

Tab. 3: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse mit wiedergefundenem 3-Ap-MJ. 3-Ap-MJ wurde aus Äthanol kristallisiert. Die Bestimmung der Zählausbeute erfolgte durch Titration mit einem Standard von $2{,}39 \cdot 10^{-3}$ Zpm.

Kristallisation	Py-3-MeC-MJ (/uMol)	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nC/uMol)
1.	0,86	$1,72 \cdot 10^4$	$3,45 \cdot 10^5$	13,70	46,60
2.	2,91	$1,19 \cdot 10^4$	$1,32 \cdot 10^4$	5,50	33,20
3.	2,44	$1,60 \cdot 10^4$	$1,87 \cdot 10^4$	11,30	26,0
4.	2,12	$1,49 \cdot 10^4$	$1,77 \cdot 10^4$	11,0	29,20
5.	1,29	$6,36 \cdot 10^3$	$8,17 \cdot 10^3$	7,56	29,10
6.	2,20	$8,40 \cdot 10^3$	$9,77 \cdot 10^3$	5,76	29,60

Tab. 4: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse von isoliertem Py-3-MeC. Die Kristallisation von Py-3-MeC erfolgte aus Isopropylalkohol. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde mit einem Standard von $2,39 \cdot 10^4$ Zpm titriert.

Isolierung von NA und Ns

Ns und NA konnten, da sie stark polare Verbindungen sind, nicht wie 3-Ap und Py-3-MeC mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Ns und NA wurden deshalb mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert. Zur Vorbereitung dazu wurden die lyophilisierten Fraktionen, in denen die Stoffe enthalten waren, in je 50 ml Aqua dest. aufgenommen und die noch stark sauren Lösungen auf pH 1,5 eingestellt. Ausgefälltes $KClO_4$ wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Die klaren Überstände wurden auf Säulen von DOWEX 50 x 8 (NH^+_4 beladen) gegeben (Höhe der Säulen 50 cm, Querschnitt 1,8 cm). NA bleibt bei pH 1,5 am Austauscher haften, da der Pyridinstickstoff bei dieser Wasserstoffionenkonzentration eine positive Ladung trägt. Die Säule wurde mit Aqua dest. solange nachgewaschen, bis die Radioaktivität im Durchlauf auf die Größenordnung eines Leerwertes abgesunken war. Die Elution von NA wurde mit 0,1 n NH_4OH vorgenommen. Das alkalisch reagierende Eluat, das NA enthält, wurde zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 20 ml heißem Aceton gelöst. In dieser Lösung wurde NA mit Methyljodid zu NA-MJ umgesetzt (s. Methoden, Punkt II). Nach Abdampfen des Aceton und des Überschusses von Methyljodid verblieb ein Rückstand von kristallinem NA-MJ. Dieses wurde für die Isotopenverdünnungsanalyse durch wiederholtes Umfällen gereinigt. Die Werte, die man für die spezifische Aktivität von NA-MJ erhält, sind in Tab. 5 wiedergegeben. Der Mittelwert der spezifischen Aktivität des isolierten NA-MJ, aus den letzten drei Kristallisationsschritten berechnet, beträgt 2,5 nC/ /uMol.

Kristallisation	NA-MJ (/uMol)	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nC/uMol)
1.	1,25	3650	9450	9,60	9,03
2.	0,96	3560	11200	12,80	8,48
3.	1,10	3360	11250	13,46	6,42
4.	0,19	295,5	938,8	26,90	2,16
5.	0,07	171,4	770,9	25,10	3,13
6.	0,09	204,7	836,5	26,40	2,91
7.	0,39	531,4	1150	25,85	2,18
8.	0,313	466,1	1128	26,10	2,29

Tab. 5: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse von isoliertem NA-MJ. Die Kristallisation von NA-MJ erfolgte aus Methanol. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde zur 1. - 3. Messung ein Standard mit $5,96 \cdot 10^4$ Zpm zugesetzt. Für die Titration der 4. - 8. Messung enthielt der Standard $2,39 \cdot 10^3$ Zpm.

Um Ns zu isolieren, wurde die entsprechende Lösung auf pH 1,5 eingestellt und auf einen Kathionenaustauscher gegeben, wie es für NA beschrieben worden ist. Bei diesem pH-Wert sind die übrigen Pyridine an den Austauscher gebunden, während sich Ns im Durchlauf befindet. Aus dieser Lösung wurde Ns durch Bindung an einen Anionenaustauscher isoliert. Dazu wurde das saure Eluat zur Trockne eingeengt, in 0,1 n NH_4OH gelöst und auf einen Permutitanionenaustauscher (Acetatform, Höhe der Säule 27 cm, Durchmesser 1,8 cm) gegeben. Bei alkalischem pH-Wert ist Ns anionisch dissoziiert und wird an den Austauscher gebunden. Die Elution von Ns erfolgte mit 1 n Essigsäure. Das Eluat, das die Ns enthielt, wurde eingeengt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und in den NsMeE überführt, wie unter Punkt III der Methoden beschrieben.
Das Verfahren zur Isolierung der Ns war jedoch so verlustreich, daß mit der anfallenden Menge keine Umkristallisation möglich war. Aus diesem Grunde wurde versucht, die zur Isotopenverdünnungsanalyse notwendige Reinigung mit Hilfe der DC in verschiedenen Flm. durchzuführen. Nach achtmaliger DC ergaben sich für den 7. und 8. Reinigungsschritt als Werte für die spezifische Aktivität des isolierten NsMeE:

$$6{,}6 \cdot 10^{-2} \text{ n C/}\mu\text{ Mol}$$
$$5{,}2 \cdot 10^{-2} \text{ n C/}\mu\text{ Mol.}$$

Obwohl diese Werte mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind, werden sie mitgeteilt, da sie wenigstens einen Anhalt über die Größenordnung vermitteln, in der wahrscheinlich Ns aus 3-Ap entsteht.

Die Menge der entstandenen Metaboliten

Aus der spezifischen Aktivität der radioaktiven Metaboliten, aus der bekannten Menge der zur Verdünnung zugesetzten inaktiven Substanzen und dem Bruchteil vom Gesamtextrakt, in dem die Bestimmung durchgeführt wurde, läßt sich die Menge an Radioaktivität bestimmen, die dem entstandenen Metaboliten zugehört. Man erhält die Menge des Metaboliten, wenn man die für ihn gefundene Radioaktivität ins Verhältnis zu der spezifischen Aktivität des Ausgangsstoffes setzt, unter der Annahme, daß bei der biologischen Umwandlung die Radioaktivität des Moleküls unverändert bleibt (s.dazu Methoden VI,g). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann man nach folgender Formel den Prozentsatz jeder Ausgangssubstanz berechnen, der in einen bestimmten Metaboliten umgewandelt wurde:

$$= \frac{\text{spezif.Akt.d.Metab. x Menge inakt.Subst. x Faktor}^{+)} \text{ x 100}}{\text{spezif.Akt.d.eingesetzt.3-Ap x Menge d.eingesetzt.3-Ap.}}$$

In der Tab. 6 finden sich die so bestimmten Werte für Py-3-MeC, NA und Ns. Außerdem ist der Prozentsatz des unverändert aus den Organen isolierten 3-Ap angegeben. Die Werte in Tab. 6 sind Mindestangaben, denn bei dem Abbau von 3-Ap geht sehr wahrscheinlich Radioaktivität verloren, vor allem, wenn Tritium in der Seitenkette lokalisiert ist. Dadurch vermindert sich die spezifische Aktivität des Metaboliten. Für Py-3-MeC ist durch Untersuchungen von ÖSTERLE (41) der prozentuale Verlust an Radioaktivität aus tritiertem 3-Ap bekannt. Er fand,

+) gegeben durch den Bruchteil vom Gesamtextrakt, in dem der Metabolit bestimmt wurde

daß Py-3-MeC nur noch 75 % der spezifischen Aktivität des 3-Ap besitzt. Die in Tab. 6 angegebenen 107,7 µMol Py-3-MeC stellen also nur 75 % der tatsächlich aus 3-Ap gebildeten Menge dar.

	I. Spezif. Aktivität der Substanzen	II. Menge der inaktiven Substanzen	III. Bruchteil vom Gesamtextrakt	IV. Menge der Metaboliten	V. % von 3-Ap
Py-3-MeC	29,3	2660	0,10	107,7	54,75
NA	2,5	2458	0,25	2,15	1,08
Ns	$5,4 \cdot 10^{-2}$	2440	0,25	0,05	0,03
3-Ap	12,4	2490	0,10	42,8	21,7

S: 77,56

Tab. 6: Ergebnis des Versuches in vivo nach Verabreichen von 3-Ap. In der Tabelle sind der Reihe nach angegeben: I. Spezifische Aktivität der isolierten Substanzen in n C/µMol, II. die Menge der Substanzen in µMol, die für die Isotopenverdünnungsanalyse in inaktiver Form zugesetzt wurde, III. der Bruchteil vom Gesamtextrakt, aus dem die entsprechende Verbindung isoliert wurde, IV. die absolute Menge der isolierten Metaboliten bzw. des unveränderten 3-Ap in µMol und V. der Prozentsatz des 3-Ap, der in die Metaboliten umgewandelt wurde bzw. der unverändert wiedergefunden wurde.

Aus dem vorangehenden Versuch ergibt sich, daß im Organismus der Ratte 3-Ap zu Py-3-MeC, NA und Ns abgebaut wird. Auf dem Höhepunkt der Vergiftung sind 50 % des 3-Ap in Py-3-MeC überführt. Nur 2o % des 3-Ap sind unverändert. Im vorliegenden Experiment gelang es, ca 77 % der applizierten Radioaktivität zu erfassen. Es bleibt offen, welche Mengen mit Urin und Fäces ausgeschieden oder in andere Verbindungen überführt worden sind.

II. Isolierung von 3-Ap, Py-3-MeC, NA, Ns, Diol und Ketol aus ganzen Ratten nach Gabe von Py-3-MeC

Für diesen Versuch wurden 200 mg tritiummarkiertes Py-3-MeC zehn weiblichen Ratten injiziert. Bei einer Gesamtaktivität von 3,33 mC ergibt sich für die spezifische Aktivität ein Wert von 2,06 $\frac{mC}{m Mol}$ des eingesetzten Py-3-MeC.

Sechs Stunden nach Applikation setzten Vergiftungserscheinungen ein, wie sie auch nach Gabe von 3-Ap beobachtet wurden. Die Tiere wurden getötet und die Kadaver in gleicher Weise verarbeitet wie im vorhergehenden Versuch. Das Homogenat von 5131,4 ml wurde diesmal in sechs Portionen geteilt und jeweils eine bestimmte Menge inaktives 3-Ap, Py-3-MeC, NA, Ns, Ketol und Diol zugesetzt (Zahlenangabe s. Tab. 11). Anschließend wurden die einzelnen Portionen durch ein Tuch filtriert, um die festen Bestandteile zu entfernen. Mittels 10 n KOH wurden die Lösungen auf pH 8 - 9 eingestellt. Ausgefallenes $KClO_4$ wurde abgenutscht.

Aus ihren wässrigen Lösungen wurden Py-3-MeC und 3-Ap mit dem dreifachen Volumen Dichlormethan extrahiert. Beide Stoffe wurden in das Methjodid überführt. Mit diesem wurde die Isotopenverdünnungsanalyse angestellt. In den Tabellen 7 und 8 finden sich die Werte, die für die spezifische Aktivität der beiden Substanzen gefunden wurden. Der Mittelwert der letzten fünf Bestimmungen ergibt für die spezifische Aktivität des wiedergefundenen Py-3-MeC 50,17 nC/μMol. Für isoliertes 3-Ap findet man als Mittel der letzten vier Messungen eine spezifische Aktivität von 9,58 nC/μMol.

Kristallisation	Py-3-MeC-MJ (/uMol)	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nC/uMol)
1.	2,12	47169	88440	18,20	55,80
2.	1,59	36969	77850	18,00	48,10
3.	1,75	42851	83930	18,10	53,50
4.	1,64	37887	77340	17,40	49,60
5.	1,24	32240	74530	18,65	50,25
6.	1,57	37975	78960	18,05	50,40
7.	1,52	37679	79520	18,45	50,20
8.	0,90	24948	66660	18,36	50,40

Tab. 7: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse für wiedergefundenes Py-3-MeC-MJ. Die Kristallisation erfolgte aus Isopropylalkohol. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde mit einem Standard titriert, der $2{,}27 \cdot 10^3$ Zpm pro 0,1 ml enthielt.

Kristallisation	3-Ap-MJ (/uMol)	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nC/uMol)
1.	1,02	7700	7870	7,0	41,50
2.	1,03	5350	5670	14,10	16,40
3.	1,05	5070	5630	24,70	8,70
4.	1,00	5010	5540	23,40	9,50
5.	1,20	5750	6400	28,60	7,50
6.	1,10	5060	8730	16,16	12,60

Tab. 8: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse für isoliertes 3-Ap-MJ. Die Kristallisation erfolgte aus Äthanol. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde im ersten bis fünften Kristallisationsschritt mit einem Standard titriert, der $2,27 \cdot 10^3$ Zpm in den zugesetzten 0,1 ml enthielt. Bei der sechsten Kristallisation wurden zur Titration $2,27 \cdot 10^4$ Zpm zugesetzt.

NA, Diol und Ketol wurden bei pH 6,0 durch viermaliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Isobutanol aus der wässrigen Lösung extrahiert. Der wassergesättigte Isobutanol wurde vollständig abgedampft. Das zurückbleibende Wasser wurde durch Destillation mit Benzol als azeotropes Gemisch entfernt. Die Rückstände wurden jeweils in 5 ml Methanol aufgenommen. Durch Zugabe von Methyljodid wurden NA, Diol und Ketol in die entsprechenden N-Methyl-Derivate umgewandelt, wie es unter Punkt II der Methoden beschrieben ist.

Die Umsetzung mit Methyljodid, die zu gut kristallisierenden Verbindungen führen sollte, gelang nur im Falle von NA. Beim Ketol und beim Diol führte die Methylierungsreaktion zu einem ölig-braunen Produkt, aus dem die gesuchten Substanzen nicht kristallisierten. Daraufhin wurden die öligen Rückstände der DC in Flm. I unterworfen. Es zeigte sich, daß außer den Methjodiden von Diol und Ketol auch freies Diol und Ketol sowie unbekannte Verunreinigungen vorhanden waren. Wiederholte Versuche, noch eine vollständige Umwandlung in die Methyljodide zu erreichen, schlugen fehl. Von dem DC wurde das Ketol eluiert und anschließend in das Pikrat umgewandelt. Die geringe Menge an Substanz gestattete insgesamt nur vier Umfällungen.

Isotopenverdünnungsanalyse mit Ketol-pikrat

Extinktion $_{450}m/\mu$	Ipm Netto	Q (Ipm/E)
1800	2980	1,65
1010	275	0,27
770	88	0,11
850	28	0,03

Für Diol wurden keine Werte erhalten, da die Kristallisation unmöglich war und durch DC nur eine sehr geringe Menge isoliert werden konnte.

Die für die Isotopenverdünnungsanalyse mit NA-MJ gefundenen Werte sind der Tab. 9 zu entnehmen. Als Mittel der letzten sechs Kristallisationsschritte erhält man für die spezifische Aktivität des isolierten NA-MJ 0,49 nC/ /uMol.

Kristallisation	NA-MJ (/uMol)	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nC/ /uMol)
1.	2,90	711,0	905,0	8,45	1,18
2.	2,52	444,0	673,0	10,10	0,67
3.	2,35	380,5	621,0	10,60	0,56
4.	1,79	297,8	573,0	12,10	0,48
5.	1,58	249,0	534,0	12,60	0,41
6.	2,31	317,5	556,0	10,50	0,46
7.	3,21	422,0	621,0	0,77	0,57
8.	3,21	434,0	3105,0	11,75	0,44

Tab. 9: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse für isoliertes NA-MJ. Die Kristallisation von NA-MJ erfolgte aus Methanol. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde bei der 1. - 7. Messung ein Standard von $2,27 \cdot 10^3$ Zpm, zur 8. Messung ein Standard von $2,27 \cdot 10^4$ Zpm zugesetzt.

Als letzte der gesuchten Substanzen wurde Ns isoliert. Dazu engten wir den wässrigen Gewebeextrakt, dem inaktive Ns zugesetzt worden war, auf 100 ml ein. Dabei fiel $KClO_4$ aus, das sich nach Erwärmen wieder auflöste. Anschließend wurden 100 ml Äthanol zugefügt, und das Gemisch wurde unter ständigem Rühren bis auf 5° C abgekühlt. Die Zugabe von Alkohol sollte verhindern, daß das ausfallende $KClO_4$ radioaktive Substanz mitreißt. Der $KClO_4$-Niederschlag wurde abfiltriert und das Wasser-Äthanol-Gemisch am Rotationsverdampfer vollständig eingeengt. Durch zweimalige Destillation mit Butanol gelang es, das restliche Wasser aus dem weißlichen Rückstand zu entfernen. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen, Ns in der methanolischen Lösung verestert und der Ester mit Methyljodid umgesetzt. Durch dieses Verfahren (s. Methoden, Punkt III) erhält man kristallines Ns-MeE-MJ, mit dem die Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt werden konnte. In der Tab. 10 sind die Ergebnisse der Isotopenverdünnungsanalyse für isoliertes Ns-MeE-MJ zusammengestellt. Der Mittelwert der letzten sechs Bestimmungen ergibt für Ns eine spezifische Aktivität von 0,22 nC/µMol.

Kristallisation	Ns-MeE-MJ (µMol)	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nC/µMol)
1.	0,33	131,12	431,64	13,22	0,79
2.	1,06	152,24	418,9P	11,75	0,35
3.	1,70	160,57	413,60	11,15	0,25
4.	1,65	145,90	439,28	12,95	0,19
5.	0,78	106,0	436,05	14,55	0,20
6.	0,79	112,80	438,90	14,35	0,23
7.	0,69	106,50	449,24	15,10	0,22
8.	0,72	112,0	454,20	15,05	0,24

Tab. 10: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse für Ns-MeE-MJ. Die Kristallisation erfolgte aus Isopropanol. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde mit einem Standard von $2,27 \cdot 10^3$ Zpm titriert.

Menge der entstandenen Metaboliten

Nach der im Teil A angegebenen Formel wurde ausgerechnet, wieviel Prozent des Py-3-MeC im Organismus der Ratte in 3-Ap, Ns und NA umgewandelt worden sind und wieviel unverändertes Py-3-MeC wiedergefunden wurde. Diese Werte sind in der Tab. 11 zusammengestellt. Auch hier handelt es sich um Mindestangaben, da nicht bekannt ist, wieviel Radioaktivität bei der Umwandlung verloren geht.

Diese Untersuchung zeigt, daß sechs Stunden nach Applikation von Py-3-MeC 42,8 % der Substanz in unveränderter Form aus den Organen von Ratten isoliert werden können. 5,4 % der als Py-3-MeC eingesetzten Radioaktivität finden sich in 3-Ap, 0,3 % in NA und 0,13 % in Ns. Ob aus Py-3-MeC auch Diol und Ketol entstehen, konnte nicht entschieden werden, da die Durchführung der Isotopenverdünnungsanalyse mit diesen Substanzen nicht gelang.

	I.	II.	III.	IV.	V.
	Spezif. Aktivität	Menge inaktiver Substanz	Bruchteil vom gesamten Homogenat	Menge d. Metaboliten	% des einges. Py-3-MeC
	(nC/µMol)	(µMol)		(µMol)	
3-Ap	9,58	3980	0,209	88,0	5,4
Py-3-MeC	50,17	4330	0,146	716,0	48,8
NA	0,49	4260	0,208	4,83	0,3
Ns	0,22	4040	0,212	2,02	0,13

S:54,63

Tab. 11: Ergebnis der Versuche in vivo nach Gabe von radioaktivem Py-3-MeC. In der Tabelle sind der Reihe nach angegeben:
I. die spezifische Aktivität der aus Gewebsextrakten isolierten Substanzen,
II. die Menge der Substanzen, die in inaktiver Form für die Isotpenverdünnungsanalyse zugesetzt wurde,
III. der Bruchteil vom gesamten Homogenat, in dem die Bestimmung erfolgte,
IV. die Menge der entstandenen Metaboliten bzw. des wiedergefundenen Py-3-MeC und
V. der Prozentsatz von Py-3-MeC, der in einen bestimmten Metaboliten umgewandelt wurde bzw. der Prozentsatz des Py-3-MeC, der unverändert isoliert wurde.

C. Untersuchung des Stoffwechsels von 3-Ap in vitro

Die vorangegangenen Versuche in **vivo** haben gezeigt, daß im Organismus der Ratte 3-Ap und Py-3-MeC in geringem Umfang zu **NA** und Ns umgewandelt werden. Beide Metaboliten machen nur einen geringen Teil der Hauptabbauprodukte aus. Um Anhaltspunkte zu gewinnen, auf welchem Wege die Umwandlung erfolgt, führten wir orientierende Versuche mit isoliertem Gewebe durch. Dabei prüften wir, ob aus den Ansätzen Metaboliten isoliert werden können, die als Zwischenglieder der Reaktionskette 3-Ap = Ns in Betracht kommen. Außerdem wurde eine Reihe von Substanzen in die Versuche als Substrat eingesetzt, von denen McKENNIS (35) annimmt, daß es sich um solche Zwischenprodukte handelt.

1. Versuche mit 3-Ap

Zunächst wurde radioaktives, chromatographisch einheitliches 3-Ap mit Leberhomogenat, Leberschnitten und mikrosomenhaltigem Cytoplasma von Leberzellen (Supernatant) inkubiert. Einzelheiten der Präparation dieser Gewebefraktionen sind bei den Methoden unter Punkt V b angegeben.

Zusammensetzung der Ansätze

A_1: 20 /uMol 3-Ap + 1 g Leberhomogenat
in 5 ml Phosphatpuffer pH 7,4

A_2: 9 /uMol 3-Ap + 500 mg Leberschnitte
in 3 ml Trispuffer pH 7,4

A_3: 18 /uMol 3-Ap + 700 mg Supernatant
in 3 ml Phosphatpuffer pH 7,4

Die Ansätze wurden 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach Hitzedenaturierung und Abzentrifugieren des koagulierten Gewebes wurde von jedem Ansatz ein aliquoter Teil zur DC auf Kieselgelplatten aufgetragen und chromatographiert. Das Ergebnis der Versuche läßt sich am besten an Hand von Skizzen der Chromatogramme und der Radiochromatogramme darstellen (Abb. 8).
Alle Chromatogramme zeigen UV-absorbierende Flecken im Bereich der Rf-Werte von 3-Ap, 3-Ac-6-Py, Py-3-MeC und NA. Da die Rf-Werte von Py-3-MeC und NA in Flm.I. fast identisch sind, gelingt die völlige Trennung beider Substanzen erst nach Elution und Rechromatographie in Flm.II. Das Ergebnis der Trennung von NA und Py-3-MeC ist für den Versuch mit Leberhomogenat (A_2) als repräsentatives Beispiel in der Abb. 8 wiedergegeben. In dem Rechromatogramm liegen beide Stoffe weit voneinander entfernt. Mittels RD läßt sich zeigen, daß nur der Flecken, der Py-3-MeC entspricht, Aktivität besitzt. Das dünnschichtchromatographisch isolierte NA ist nicht aus 3-Ap entstanden, sondern stammt, wie Versuche mit Ansätzen, die nur Leberhomogenat enthielten, zeigen, aus dem Gewebe selbst.

Von den Verbindungen, die außer Py-3-MeC aus Inkubaten mit 3-Ap isoliert wurden, erwiesen sich nicht umgesetztes 3-Ap und 3-Ac-6-Py als radioaktiv. Radioaktivität fand sich über der Auftragstelle. In den Abschnitten der Chromatogramme, wo sich eventuell entstandene Ns hätte befinden müssen, war weder UV-Absorption noch Radioaktivität festzustellen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Inkubate von 3-Ap mit Leberhomogenat, Leberschnitten und Supernatant das gleiche qualitative Ergebnis liefern: Aus den Ansätzen werden durch DC 1. nicht abgebautes 3-Ap, 2. 3-Ac-6-Py und 3. Py-3-MeC als Metaboliten des

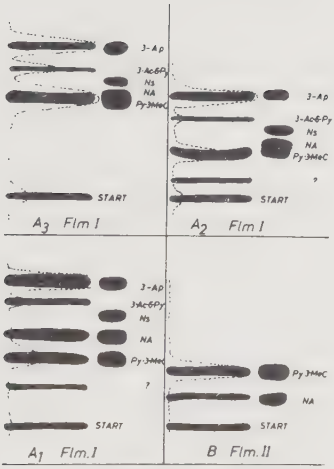


Abb. 8. DC von Inkubaten mit 3-Ap und Supernatant (A_3), Leberschnitten (A_2) und Homogenat (A_1)
B. Trennung NA und Py-3-MeC aus A_2 in Flm II

eingesetzten 3-Ap isoliert. Ob bei diesen Versuchen auch NA und Ns in geringen Mengen entstehen, läßt sich noch nicht entscheiden, da die Methode der RD nicht empfindlich genug ist, um kleine Quantitäten an radioaktiver Substanz nachzuweisen.

Ein geeignetes Verfahren, geringe Mengen an Radioaktivität nachzuweisen, stellt die Isotopenverdünnungsanalyse dar. Deshalb versuchten wir, aus einem Ansatz mit Leberhomogenat und 3-Ap Ns zu isolieren und damit eine Isotopenverdünnungsanalyse durchzuführen. Der entsprechende Ansatz enthielt in 5 ml Gesamtvolumen 4 ml Leberhomogenat und 2,6 mg 3-Ap (≙ 21,5 /uMol). Das radioaktive 3-Ap war in 1,0 ml Phosphatpuffer von pH 7,4 gelöst. Die spezifische Aktivität des eingesetzten 3-Ap betrug 115 /uC/ /uMol. Der Ansatz wurde 60 Min. bei 37°C inkubiert. Unmittelbar vor dem Hitzedenaturieren wurden zu dem Ansatz 0,5 mg inaktive Ns zugegeben. Mit dieser Maßnahme sollte zweierlei erreicht werden: 1. Verdrängung der eventuell entstandenen kleinen Menge radioaktiver Ns aus adsorptiven Bindungen und 2. Markierung der gesuchten Ns im DC.
Vom Überstand des Inkubates wurden nach dem Zentrifugieren 1,8 ml zur DC in Flm. II aufgetragen. In dem Bereich der DC, an dem sich Ns befand, wurde das Kieselgel abgekratzt und mit Methanol dreifach eluiert. Der methanolischen Lösung wurden für die Isotopenverdünnungsanalyse 100 mg inaktive Ns zugesetzt. Als nächster Schritt wurde die Umwandlung der Ns in NsMeE und anschließend in NsMeE-MJ vorgenommen, wie es unter Punkt III der Methoden beschrieben ist. Die DC eines aliquoten Teiles der Lösung von NsMeE-MJ ergab, daß die Überführung der Ns in NsMeE-MJ quantitativ abgelaufen war. Der Methylalkohol wurde abgedampft, und es verblieb ein brauner, kristallisierender Rückstand.

Mit diesen Kristallen wurde die Isotopenanalyse durch fünfmaliges Umfällen aus Isopropanol durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tab. 12 zusammengefaßt. Als Mittelwert der fünf Kristallisationsschritte erhält man für Ns, die aus 3-Ap in Gegenwart von Leberhomogenat gebildet wurde, eine spezifische Aktivität von $7{,}15 \cdot 10^{-2}$ nC/µMol. Unter Zugrundelegung dieses Wertes und der spezifischen Aktivität des eingesetzten 3-Ap läßt sich entsprechend der früher angegebenen Formel berechnen, daß 0,07 °/oo des 3-Ap in Ns umgewandelt worden sind.

Kristallisation	Extinktion bei 264 mµ	Aktivität vor Titration (Ipm)	Aktivität nach Titration (Ipm)	Leerwert (Ipm)	Zählausbeute (%)	Spezif. Aktivität des NsMeEMJ (nC/µMol)
1.	$6{,}8 \cdot 10^4$	83,9	135,9	40,2	2,3	$5{,}5 \cdot 10^{-2}$
2.	$2{,}2 \cdot 10^4$	116,3	305,2	34,7	8,3	$8{,}1 \cdot 10^{-2}$
3.	$9{,}9 \cdot 10^3$	75,6	363,7	30,2	12,6	$6{,}9 \cdot 10^{-2}$
4.	$6{,}7 \cdot 10^3$	92,8	428,7	37,9	14,7	$8{,}9 \cdot 10^{-2}$
5.	$1{,}9 \cdot 10^3$	50,2	515,4	30,6	20,4	$6{,}3 \cdot 10^{-2}$

Tab.12: Ergebnis der Isotopenverdünnungsanalyse mit NsMeEMJ aus Versuchen in vitro. Die für Extinktion und Radioaktivität angegebenen Werte wurden in 0,2 ml der Mutterlauge gemessen. Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde mit $2{,}28 \cdot 10^3$ Zpm titriert. Da die Aktivität nur das Doppelte des Leerwertes betrug, wurden alle Impulszählungen in vier Einzelbestimmungen von insgesamt 80 Min. Dauer vorgenommen, um apparative Schwankungen möglichst klein zu halten.

Aus demselben Versuchsansatz, aus dem Ns isoliert wurde, sollte ebenfalls NA abgetrennt werden, um mittels Isotopenverdünnungsanalyse zu prüfen, ob aus 3-Ap auch NA entsteht. Zu diesem Zweck wurden dem Inkubat 0,5 mg inaktives NA zugesetzt. 1,8 ml des Überstandes wurden in Flm.II der DC unterworfen. Der Bereich des DC, wo sich NA befand, wurde ausgekratzt, mit Methanol eluiert und die Aktivität im Eluat gegenüber einem Leerwert im Szitillationszähler gemessen. Die ermittelte Impulszahl lag jedoch nur 19 Ipm über dem "back-ground" von 29 Ipm und damit innerhalb der doppelten Fehlerbreite unserer Methode. Nachdem dieses Ergebnis durch drei weitere Versuche bestätigt werden konnte, verzichteten wir auf die Durchführung einer Isotopenverdünnungsanalyse mit NA.

Bei der Inkubation von 3-Ap mit Leberhomogenat entsteht Ns in einer äußerst geringen Menge. Bildung von NA konnte nicht nachgewiesen werden.

Es wurde nun versucht, durch Zusatz verschiedener Stoffe, die möglicherweise prostetische Gruppen bei der Umwandlung von 3-Ap zu Ns sind, günstigere experimentelle Bedingungen für den Abbau zu Ns zu finden.

A. ÖSTERLE (41) hat beobachtet, daß aus 3-Ap in vitro mehr Py-3-MeC gebildet wird, wenn die Ansätze NADPH enthalten. Falls Py-3-MeC Zwischenprodukt der Reaktionskette von 3-Ap zu Ns ist, dann sollte der Zusatz von NADPH die Bildung von Ns beschleunigen. 3-Ap wurde deshalb mit Leberhomogenat in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems inkubiert (über dessen Zusammensetzung s. Punkt IV, 1 der Methoden).

Die Zusammensetzung der Ansätze, die Inkubationsbedingungen und die Aufarbeitung stimmten im übrigen mit denen der vorangegangenen Versuche überein.

Nach DC-Trennung der im Inkubat enthaltenen Stoffe findet man die bereits bekannten Metaboliten des 3-Ap. Die kräftige NA-Bande weist keine Radioaktivität auf. Es handelt sich also nur um NA, das aus abgebautem NADP entstanden ist. An der Stelle im DC, wo Ns zu erwarten wäre, fand sich keine UV-Absorption. Trotzdem wurde das Kieselgel in diesem Abschnitt eluiert. Das Eluat wurde im Szintillationszähler auf Radioaktivität untersucht. Zum Vergleich wurde die Radioaktivität herangezogen, die im Bereich der Ns aus einem Ansatz ohne Cofaktoren registriert wurde. Der "back-ground" wurde aus einem sofort nach Zugabe von 3-Ap denaturierten Inkubationsgemisch gewonnen. Die hierbei gefundenen Werte betrugen: 1."back-ground" 42 Ipm, 2.Ansatz ohne NADPH 54 Ipm, 3.Ansatz mit NADPH 76 Ipm. Diese geringe Differenz gestattete die Aussage, daß unter den eingehaltenen Bedingungen die Gegenwart von NADPH keinen Einfluß auf die Bildung von Ns ausübt.

Als Nachtrag sei noch vermerkt, daß aus den Ansätzen, die neben Leberzellhomogenat und 3-Ap auch NADPH enthielten, eine Substanz isoliert wurde, deren UV-Absorptionsspektrum in 0,1 n HCl ein Maximum bei 247-248 m/u und in 0,1 n NaOH bei 258-260 m/u besitzt. Bei Chromatographie in Flm. I beträgt der Rf-Wert 0,23, d.h. die Substanz läuft zwischen Start und NA. Sie ist nicht radioaktiv. ÖSTERLE (41) findet bei Untersuchungen mit Supernatant, 3-Ap und NADPH eine Verbindung mit entsprechenden Eigenschaften, von der er annimmt, daß es sich um ein Spaltprodukt von Pyridincofermenten handelt.

B. Um zu prüfen, ob mit zunehmender Inkubationszeit die Bildung von Ns in besser erkennbarem Umfang verläuft, wurden Versuchsansätze 10, 20, 30, 60 und 120 Min.lang inkubiert. Die Ansätze enthielten 1,5 mg 3-Ap, 10 µMol NADPH und 150 mg Leberhomogenat in 1,4 ml

Phosphatpuffer (pH 7,4). Nach Hitzedenaturierung und Zentrifugation wurde der Überstand in Flm. II chromatographiert. Das DC zeigte eine Spur UV-absorbierender Substanz mit dem Rf-Wert von Ns. Diese wurde mit 0,1 n HCl eluiert, um das Spektrum aufzuzeichnen. Mit Ausnahme der aus dem 120 Min. inkubierten Ansatz eluierten Substanz war die Menge zu gering, um ein typisches Spektrum zu erhalten. Die UV-Absorptionskurve wies in 0,1 n HCl den für Ns charakteristischen Verlauf auf mit dem Maximum bei 261 m/u. In 0,1 n NaOH verschob sich das Maximum jedoch nach 256 m/u, während Ns bei alkalischer Reaktion sein Maximum bei 263 m/u hat. Die Extinktion bei 261 m/u betrug 250 Einheiten. Dazu mußte die gesamte Substanz eingesetzt werden, so daß für weitere Untersuchungen kein Material übrigblieb. Aus diesen Versuchen folgt, daß die Ausdehnung der Inkubationszeit bis auf 120 Min. nicht zu einer vermehrten Bildung von Ns führt.

C. BEHER (5) konnte zeigen, daß bei der Verkürzung der Seitenkette von 3-Ap die Übertragung eines C_1-Bruchstückes auf Glycin unter Bildung von Serin stattfindet. Diese Reaktion wird nach SCRIMGEOUR (43) durch Serinaldolase katalysiert, die in Gegenwart von Tetrahydrofolsäure und Pyridoxalphosphat wirksam ist. Um zu prüfen, ob dieses Enzym unter unseren Versuchsbedingungen tatsächlich einen Einfluß auf die Bildung von Ns aus 3-Ap nimmt, wurde 3-Ap mit Leberhomogenat in Gegenwart von Glycin, Folsäure und Pyridoxalphosphat inkubiert. Die Koenzyme sind im methodischen Teil unter Punkt IV, 2 und 4 beschrieben. Wir gingen davon aus, daß Leberhomogenat sowohl Serinaldolase enthält als auch Folsäurereduktase, die die Folsäure erst in die wirksame Tetrahydrofolsäure überführt.

Zusammensetzung der Ansätze:

A_1 enthielt: 8 µMol radioaktives 3-Ap
10 µMol Glycin in Trispuffer pH 7,4
0,6 ml Leberhomogenat
(Volumen des Ansatzes 1,4 ml)

A_2 enthielt: 20 µMol radioaktives 3-Ap
10 µMol Pyridoxalphosphat
4,0 ml Leberhomogenat
(Volumen des Ansatzes 6,0 ml)

A_3 enthielt: 20 µMol radioaktives 3-Ap
2,3 µMol Folsäure
4,0 ml Leberhomogenat
(Volumen des Ansatzes 6,0 ml)

A_4 enthielt: 20 µMol radioaktives 3-Ap
2,3 µMol Folsäure
10 µMol Pyridoxalphosphat
10 µMol Glycin
4,0 ml Leberhomogenat
(Volumen des Ansatzes 6,0 ml)

Als Kontrollen wurden Ansätze, die Leberhomogenat und Pyridoxalphosphat bzw. Folsäure enthielten, ebenfalls 90 Min. inkubiert.

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem bereits mitgeteilten Schema. Im DC des Ansatzes mit Glycin traten drei UV-absorbierende Flecken auf. Die dort befindlichen Substanzen wurden eluiert und ihr Spektrum geschrieben.

Die erhaltenen UV-Absorptionskurven konnten weder Ns noch einem anderen fraglichen Metaboliten zugeordnet werden. Die DC der anderen Ansätze ergaben das von den vorangehenden Versuchen bekannte Bild. Das Radiochromatogramm zeigte Aktivität über den Flecken des Py-3-MeC, des 3-Ac-6-Py und des nicht umgesetzten 3-Ap. An der Stelle, wo Ns zu erwarten wäre, findet sich weder UV-Absorption noch Radioaktivität. Über dem Flecken, der NA entspricht, wurde keine Radioaktivität registriert. NA stammt aus dem Lebergewebe, wie aus dem DC der Kontrollen hervorgeht. Pyridoxalphosphat und Folsäure bleiben am Start liegen. Damit zeigt sich, daß unter den gewählten Bedingungen die Gegenwart von Glycin, Pyridoxalphosphat und Folsäure die Bildung von Ns nicht fördert.

D. Das negative Resultat der bisher geschilderten Untersuchungen hinsichtlich der Bildung von Ns aus 3-Ap ließ daran denken, daß eventuell Enzyme aus verschiedenen Organen nacheinander einwirken müssen, damit die Oxydation der Seitenkette von 3-Ap ablaufen kann. Deshalb untersuchten wir den Abbau der Substanz bei gleichzeitiger Einwirkung von Leber- und Nierengewebe. Zu diesem Versuch wurden wir angeregt durch Experimente von BOYLAND (6), der beobachtet hatte, daß die einzelnen Reaktionsschritte bei der Merkaptursäurekonjugation von Naphthalin nacheinander in der Leber, der Niere und wieder in der Leber vor sich gehen. Zuerst prüften wir die Einwirkung von Nierenhomogenat auf 3-Ap. Das DC eines solchen Ansatzes weist als einzigen Metaboliten des 3-Ap Py-3-MeC auf. 3-Ac-6-Py, das bei Inkubation mit Leberhomogenat regelmäßig aus 3-Ap entsteht, wird in Gegenwart von Nierengewebe nicht gebildet. Die gleiche Feststellung trifft auch ÖSTERLE (41).

Um die Abbauvorgänge des 3-Ap zu studieren, wenn die Ansätze gleichzeitig Leber- und Nierengewebe enthalten, wurden 20 µMol der Substanz in Gegenwart von je 1 g Leber- und Nierenschnitten in Phosphatpuffer von pH 7,4 60 Min. bei 37°C inkubiert.

Die Aufbereitung der Ansätze erfolgte in der gewohnten Weise. DC und RC zeigten das von den Versuchen mit Leberhomogenat bekannte Bild. Radioaktivität wurde dort registriert, wo sich im DC die 3-Ap, Py-3-MeC und 3-Ac-6-Py repräsentierenden Flecken befanden. Über dem Flecken von NA wurde keine Aktivität gefunden. An der Stelle, wo Ns zu erwarten wäre, registrierten wir weder UV-Absorption noch Radioaktivität. Weder der Zusatz von NADPH, noch die Erhöhung des O_2-Partialdruckes im Reaktionsgemisch änderten etwas am negativen Ausfall der Versuche hinsichtlich der Bildung von Ns.

2. Untersuchungen mit Py-3-MeC

Py-3-Methylcarbinol (Py-3-MeC) ist nach McKENNIS das erste Abbauprodukt auf dem Wege von 3-Ap zur Ns. Aus eigenen Untersuchungen, die in vivo durchgeführt wurden, ging hervor, daß 3 °/oo der als Py-3-MeC applizierten Radioaktivität als NA und 1 °/oo als Ns wiedergefunden wurden.

Um eine Vorstellung von den biochemischen Umwandlungen zu gewinnen, denen Py-3-MeC unterliegt, wurden mit dieser Substanz ebenfalls Untersuchungen in vitro durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden 20 µMol tritiiertes Py-3-MeC mit Homogenat von 1 g Rattenleber inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurde Pyridoxalphosphat bzw. Folsäure zugesetzt. Dafür gelten die gleichen Überlegungen,

wie sie im Abschnitt über den Abbau des 3-Ap dargestellt worden sind. Die Konzentration von Pyridoxalphosphat in den Ansätzen mit 6,0 ml Gesamtvolumen betrug $1,7 \cdot 10^{-3}$M, für Folsäure betrug sie $3,77 \cdot 10^{-3}$M.

Die Inkubation und Aufarbeitung wurde wie bei den entsprechenden Versuchen mit 3-Ap durchgeführt. Das DC in Flm. I der Ansätze, die nur Py-3-MeC und Homogenat enthielten, ergab sechs voneinander getrennte, UV-absorbierende Flecken. Diese wurden von der Front zum Start fortlaufend von 1 bis 6 nummeriert. Mit dem Gasflußzähler wurde Aktivität über dem Start, über dem Flecken 4 - in Höhe des Py-3-MeC-Tests - und über dem Flecken 3 im Bereich des NA-Tests festgestellt. Für die übrigen Banden ließ sich nach dem RD nicht entscheiden, ob sich dort kleine Mengen Radioaktivität befinden, da sie teilweise zu nahe an dem großen Peak von Py-3-MeC liegen. Deshalb wurden die UV-absorbierenden Flecken eluiert und erneut der DC unterworfen. Im Rechromatogramm erweisen sich die Flecken 1, 2, 5 und 6 als einheitlich zum Zeichen, daß es sich dabei um jeweils eine einzige Substanz handelt. Keiner der vier Flecken war radioaktiv. Auf die weitere Untersuchung wurde daher verzichtet. Die Rechromatographie der Substanz, die dem Flecken 4 entspricht, ergab ebenfalls eine einzige einheitliche Bande. Nach der Lage im DC und dem UV-Spektrum wurde diese Substanz als Py-3-MeC identifiziert. Außerdem stellt die hohe Radioaktivität dieser Verbindung ein Indiz dar, daß es sich um nicht umgesetztes Py-3-MeC handelt. Aus dem Fleck 3 trennten sich bei Rechromatographie in dem Lösungsmittelgemisch Äthanol : Chloroform (30 : 70) drei UV-absorbierende Substanzen ab. Eine davon, die Radioaktivität besaß, erwies sich als Py-3-MeC. Von den beiden

inaktiven Stoffen konnte der eine als NA identifiziert werden, das sich aus Leberhomogenat abtrennt. Die dritte Substanz entspricht einer unbekannten Verbindung, deren maximale UV-Absorption in 0,1 n HCl bei 279 m/u, in 0,1 n NaOH bei 330 m/u und in Methanol bei 260 m/u liegt.

Die DC der Inkubate von Py-3-MeC mit Pyridoxalphosphat und Folsäure zeigen bis auf das Fehlen der frontnahen Flecken 1 und 2 die gleichen Flecken mit der gleichen Radioaktivitätsverteilung wie das DC des Inkubates ohne Zusatz von Koenzymen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß Py-3-MeC in Gegenwart von Leberhomogenat nicht verändert wird, denn nach dünnschichtchromatographischer Analyse der Inkubate wurden keine radioaktiven Substanzen außer dem eingesetzten Py-3-MeC gefunden.

3. Untersuchungen mit (3-Pyridyl)-1,2-äthandiol

(3-Pyridyl)-1,2-äthandiol (Diol) ist eines der von Mc KENNIS (35) aus dem Urin von Hunden isolierten Stoffwechselprodukte des 3-Ap. Nach den Vorstellungen dieses Autors soll die Verbindung aus Py-3-MeC entstehen und dann in 3-Pyridylglykolaldehyd (Glykol) überführt werden. Um das nachzuprüfen, wurde in eigenen Untersuchungen synthetisches Diol mit Leberhomogenat inkubiert. Das DC des Inkubats wies zwei UV-absorbierende Flecken auf. Dabei handelt es sich um NA, das aus dem Gewebe stammt, und um unverändertes Diol. DC von Ansätzen, die Pyridoxalphosphat und Folsäure enthielten, zeigen das gleiche Bild.

Außerdem wurde das Diol mit Supernatant 60 Min. inkubiert. Die Ansätze enthielten NADP einmal in reduzierter, einmal in oxydierter Form. Die Aufarbeitung

erfolgte wie in den vorangehenden Versuchen. Die DC dieser Ansätze wiesen UV-absorbierende Flecken mit dem Rf-Wert von NA und Diol auf. Aus dem Inkubat mit NADPH wurde mit einem weiteren UV-absorbierenden Flecken eine Substanz isoliert, deren Rf-Wert in Flm. II 0,14 beträgt und deren UV-Spektrum folgende Charakteristika besitzt: In 0,1 n HCl Maximum bei 260 - 261 m/u, in 0,1 n NaOH drei Maximima bei 255, 261, 266 m/u. Minima in 0,1 n HCl bei 227 m/u, in 0,1 n NaOH bei 231 m/u.

Diese UV-Absorptionskurve zeigt Übereinstimmung mit dem Spektrum, wie es außerdem Diol, Glykol-S und Py-3-MeC besitzen. NA, Diol und Py-3-MeC kommen wegen ihres abweichenden Rf-Wertes nicht in Betracht. Es bleibt offen, um welche Substanz es sich bei diesem Reaktionsprodukt handelt.

4. Untersuchungen mit ω-Oxyacetyl-pyridin

ω-Oxyacetyl-pyridin (Ketol) ist ebenfalls eine Substanz, von der wir glauben, daß sie ein Zwischenglied des Abbauweges von 3-Ap zu Ns darstellt. Sie könnte durch Oxydation aus 3-Ap entstehen und zu Pyridyl-3-glyoxylsäure weiter oxydiert werden. Der Ketol wurde ebenso wie die bisher besprochenen Substanzen mit Leberhomogenat inkubiert, um die möglicherweise stattfindenden Umsetzungen dieser Verbindung zu beobachten.

Ein Ansatz enthielt 20 /uMol Ketol in 2,0 ml Phosphatpuffer gelöst und 4,0 ml Leberhomogenat. Die Aufarbeitung erfolgte nach der bereits geschilderten Methode. Bei der DC in Flm. I trennten sich aus dem Inkubat vier UV-absorbierende Flecken ab. Eine der in den Flecken enthaltenen Substanzen hat Rf-Wert und Spektrum wie NA, das sich aus Leberhomogenat abtrennt. Bei einer

weiteren Substanz, die isoliert wurde, handelt es sich um nicht abgebautes Ketol, wie Spektrum und Lage im DC zeigen. Dicht über der Auftragstelle liegt eine Substanz, deren Rf-Wert in Flm. I und deren UV-Spektrum mit Pyridyl-3-glyoxylsäure übereinstimmen (s. Abb. 4). Schließlich findet sich als vierte Substanz eine unbekannte Verbindung, deren Rf-Wert von 0,2 und deren UV-Spektrum mit Diol übereinstimmen.

Die Versuche mit Ketol haben gezeigt, daß aus dieser Substanz in Gegenwart von Leberhomogenat zwei Verbindungen entstehen, bei denen es sich möglicherweise um Pyridyl-3-glyoxylsäure und Diol handelt. Diesen Befunden konnte jedoch nicht nachgegangen werden, da Ketol nicht in radioaktiver Form vorlag.

5. Untersuchungen mit Pyridyl-3-glykolsäure

Pyridyl-3-glykolsäure (Glykol-S) stellt möglicherweise beim Abbau des 3-Ap die Zwischensubstanz dar, die aus 3-Pyridylglykolaldehyd entsteht und weiter zu Glyoxyl-S umgewandelt wird. Glykol-S wurde in der gleichen Weise wie die übrigen Substanzen mit Leberhomogenat inkubiert, um zu prüfen, ob der oben geschilderte Abbau tatsächlich stattfindet. Als Kontrollen dienten ein Ansatz, der nur Homogenat in Phosphatpuffer enthielt, und ein Ansatz mit Glykol-S in Phosphatpuffer.

Die DC der Ansätze ergaben folgendes Bild:
In Phosphatpuffer allein bleibt Glykol-S unverändert. Aus inkubiertem Leberhomogenat ohne Substrat trennt sich NA ab. Wird Glykol-S mit Leberhomogenat inkubiert, so tritt nach 30 Min. eine Substanz auf mit dem Rf-Wert von 0,24 in Flm. I und einem charakteristischen UV-Spektrum. Dieses Spektrum mit den Maxima 247 m/u in 0,1 n HCl bzw. 260 m/u in 0,1 n NaOH konnte keiner

bekannten Pyridinverbindung zugeordnet werden. Spektrum und Rf-Wert dieser Substanz stimmen überein mit der Verbindung, die S.63 als Abbauprodukt von Pyridincofermenten beschrieben worden ist. Ob es sich um einen Metaboliten von Pyridyl-3-glykolsäure handelt, konnte nicht entschieden werden, da das Ausgangsmaterial nicht radioaktiv markiert zur Verfügung stand. Ns und Glyoxyl-S waren auf dem DC nicht zu finden.

6. Untersuchungen mit Pyridyl-3-glyoxylsäure

Pyridyl-3-glyoxylsäure (Glyoxyl-S) stellt nach McKENNIS (35) das letzte Glied des Abbauweges von 3-Ap zur Ns dar. Glyoxyl-S soll aus Glykol-S entstehen und nach Dekarboxylierung in Ns übergehen (s.Abb. 1). Im Folgenden wurde geprüft, ob die in Leberzellen enthaltenen Fermentsysteme diese Ketosäure zu dekarboxylieren vermögen. In die Versuche wurde Glyoxyl-S eingesetzt, die von KORANSKY und MÜNCH synthetisiert und mit Tritium radioaktiv markiert worden war. Glyoxyl-S ist eine α-Ketosäure. Für die Dekarboxylierung von α-Ketosäuren sind eine Reihe von Abbauweisen beschrieben worden. So fanden HOLZER et al. (23), daß Pyruvat, ehe die Dekarboxylierung zum C_2-Bruchstück erfolgt, an Thiaminpyrophosphat gebunden wird. Dabei entsteht intermediär α-Hydroxyäthyl-2-Thiaminpyrophosphat, von HOLZER als "aktiver Glykolaldehyd" bezeichnet. Soll die Reaktion zur Essigsäure führen, so müssen α-Liponsäure und NAD als Wasserstoffträger anwesend sein. Das Enzym dieser Dekarboxylierung, die Pyruvatoxydase, läßt sich aus Hefe, Weizenkeimen, aus dem Brustmuskel der Taube und aus Schweineherzen isolieren.

Thiaminpyrophosphat ist ebenfalls Coenzym bei der Dekarboxylierung von Benzylformiat durch Bakterien, wobei Benzaldehyd gebildet wird. Diese Reaktion ist von GUNSALUS beschrieben worden (18).

Ein Beispiel einer α-Ketosäure, die als Seitenkette an einem ungesättigten 6-Ring sitzt und deren Dekarboxylierung durch Gewebe vom Warmblüter Vorbild für die Dekarboxylierung von Glyoxyl-S sein könnte, wurde im Abbau von 4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl-glyoxylsäure zu Vanillin und Vanillinsäure gefunden. Diese Reaktion spielt sich nach DIRSCHERL (15) beim Abbau des Metanephrin bzw. der 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure in Gegenwart von Rattenlebergewebe ab.

Bei den eigenen Untersuchungen wurde Glyoxyl-S ebenfalls mit Homogenat von Rattenleberzellen inkubiert.

Die Versuchssätze enthielten:

Ansatz 1: 14,4 µMol Glyoxyl-S in 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4
plus 4 ml Leberhomogenat

Ansatz 2: wie A_1

Ansatz 3: 14,4 µMol Glyoxyl-S in 5 ml Puffer.

Die Ansätze A_1 und A_3 wurden bei 37°C 90 Min. inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 100°C gestoppt. In Ansatz 2 wurde die Reaktion nach 30 Min. gestoppt. Je 0,9 ml des Überstandes, den man nach Zentrifugieren der Ansätze erhält, wurden in Flm. I der DC unterworfen. Die Chromatogramme aller drei Ansätze zeigen im Bereich der als Test mitchromatographierten reinen Ns einen UV-absorbierenden, radioaktiven Flecken. Die dort befindliche Substanz erweist

sich durch die Lage im DC und ihre UV-Spektren als Ns (Abb. 9). Aus der gemessenen Extinktion wurde die Menge der entstandenen Ns bestimmt. Danach sind aus 14,4 µMol Glyoxyl-S in Gegenwart von Leberhomogenat nach 30 Min. 0,99 µMol Ns und nach 90 Min. 1,7 µMol Ns gebildet worden. Glyoxyl-S ist allerdings in Pufferlösung nicht stabil, denn auch aus dem Ansatz ohne Gewebshomogenat wurde nach 90 Min. Ns in einer Menge von 0,25 µMol isoliert. Die Abb. 9 zeigt ein DC der Versuche mit Glyoxyl-S.

Dieser Versuch hat gezeigt, daß in der Leber enthaltene Enzyme Glyoxyl-S zu dekarboxylieren vermögen. Anschließend wurde durch Zusatz von Cocarboxylase geprüft, ob sich diese Reaktion beschleunigen läßt; d.h. ob in der Zeiteinheit mehr Ns gebildet wird. Dazu wurde Glyoxyl-S in der oben beschriebenen Weise mit Leberhomogenat inkubiert. Die Ansätze enthielten außerdem Thiaminpyrophosphat in einer Konzentration von $8{,}3 \cdot 10^{-4}$ Mol (über Thiaminpyrophosphat s. Methoden IV, Punkt 3). Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte in der oben geschilderten Weise. Im DC fand sich an der Stelle, wo nach dem Vergleich mit Testsubstanz Ns liegen sollte, ein UV-absorbierender Fleck, über dem Radioaktivität registriert werden konnte. Diese Substanz konnte jedoch nicht weiter untersucht werden, da die geringe Menge nicht die Aufzeichnung eines typischen UV-Spektrums zuließ.

In parallelen Versuchen mit Muskelhomogenat fand sich zwar im Bereich von Ns UV-Absorption, jedoch genügte die isolierte Substanzmenge nicht, um ein Spektrum davon aufzunehmen.

Da die Menge an Ns, die in Gegenwart von Lebergewebe und Muskulatur entsteht, sehr gering ist, andererseits aber von BEHER (5) beschrieben wurde, daß bei 74 %

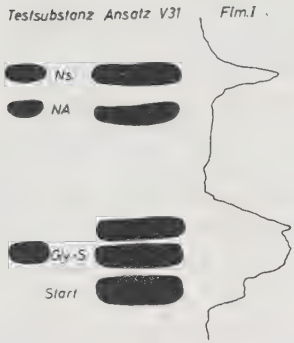


Abb.9a: DC und RD eines Inkubates mit Glyoxyl-S

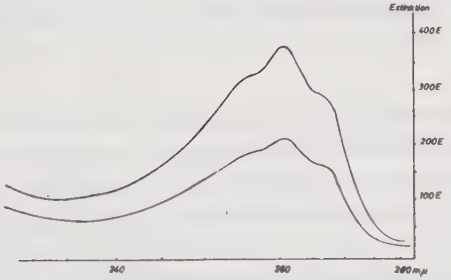


Abb.9b: Spektrum von Ns aus Ansätzen mit Glyoxyl-S. untere Kurve nach 30Min., obere nach 90Min. Inkubation.

des 3-Ap im Organismus eine Abspaltung des endständigen Kohlenstoffatoms der Seitenkette stattfindet; d.h., daß damit die Voraussetzung zur Bildung von Ns bzw. NA in weit größerem Umfang gegeben ist, wurde daran gedacht, daß die Darmflora in irgendeinem Stadium des 3-Ap-Abbaus - z.B. der Dekarboxylierung von Glyoxyl-S - eingreifen könnte. Allerdings lehnt BEHER (4) die Mitwirkung von Mikroorganismen am Stoffwechsel des 3-Ap ab. Er machte den Darm seiner Versuchstiere durch Gabe eines Sulfonamids keimarm und konnte anschließend nach Applikation von 3-Ap keine Veränderung der NM-NA-Ausscheidung feststellen.

Da von GUNSALUS (18) am Beispiel des Benzylformiats gezeigt worden ist, daß Bakterien der Darmflora α-Ketosäuren zu dekarboxylieren vermögen, untersuchten wir dennoch, ob Darmkeime von der Ratte Glyoxyl-S zu Ns abbauen können. Die Bakterien für die folgenden Versuche wurden aus dem Dickdarm frisch getöteter Ratten gewonnen, indem der Darminhalt mit Phosphatpuffer aufgeschwemmt wurde.

3,0 ml dieser Suspension mit 1 g Darminhalt wurden mit 14 µ Mol Glyoxyl-S 3o Min. inkubiert. Nach der üblichen Aufarbeitung wies das DC eine UV-absorbierende, radioaktive Substanz mit dem Rf-Wert der Ns auf. Bei dieser Substanz handelt es sich tatsächlich um Ns, wie das typische UV-Spektrum zeigt. Aus der Extinktion berechnete sich die Menge der entstandenen Ns zu 246 µg pro Ansatz; d.h. aus 14 µMol eingesetzter Glyoxyl-S sind 2,0 µMol Ns entstanden. Dies ist zweimal mehr, als in Gegenwart von Lebergewebe gebildet worden war. Der Versuch mit Darmkeimen wurde auch unter Zugabe von Thiaminpyrophosphat durchgeführt. Die Menge an Ns, die dabei isoliert wurde, betrug 2,0 µMol. Das ist soviel wie im Versuch ohne Coferment. Thiaminpyrophosphat

beeinflußt unter den gegebenen Bedingungen den Abbau von Glyoxyl-S zu Ns offenbar nicht.

Bei Untersuchungen mit Glyoxyl-S und einem NADPH regenerierenden System (dessen Zusammensetzung s. Punkt IV, 1 der Methoden) wurde eine interessante Beobachtung gemacht. Die Inkubation wurde in Gegenwart von Leberhomogenat und von Darmbakterien durchgeführt. Um die notwendigen Leerwerte zu erfassen, wurde in einem Teil der Ansätze sofort nach der Zugabe von Glyoxyl-S die Reaktion durch Erhitzen gestoppt. Im DC des Leerwertes mit Leberhomogenat findet sich an der Stelle, wo Ns liegen müßte, keine UV-Absorption, während aus dem Leerwert mit Darmkeimen Ns in der Menge von 1,2 /uMol isoliert wurde. Nach 30 Min. Inkubation findet man in dem Ansatz mit Darmkeimen 2,5 /u Mol Ns und im Ansatz mit Lebergewebe 0,6 /uMol Ns. Offenbar läuft die Dekarboxylierung in Gegenwart von Darmkeimen innerhalb von Bruchteilen einer Minute ab. Im weiteren Verlauf wird dann nur noch wenig Ns gebildet.

Einige oxydative Dekarboxylierungsreaktionen finden in Mitochondrien statt. Deshalb wurde Glyoxyl-S zusammen mit Thiaminpyrophosphat, Coenzym-A, einem NADH-regenerierenden System und Mitochondrien inkubiert, die eine Arbeitsgruppe aus dem Pharmakologischen Institut zur Verfügung stellte. Die DC dieser Ansätze zeigten zwar eine UV-absorbierende Substanz mit dem Rf-Wert von Ns, aber die Menge war zu gering, um ein typisches UV-Spektrum aufnehmen zu können.

Aus den vorangehenden Untersuchungen ergibt sich, daß Glyoxyl-S von Enzymen, die im Lebergewebe enthalten sind, und von Keimen der Darmflora zu Ns umgewandelt wird. Unter den vorliegenden Bedingungen betrug der

Umsatz etwa 10 %. Durch Zugabe von Thiaminpyrophosphat ließ er sich nicht steigern, obwohl es sich bei der Reaktion um eine oxydative Dekarboxylierung handeln dürfte.

Ergebnisse der Untersuchungen in vitro

Den Abschluß dieses Kapitels, in dem die In-Vitro-Untersuchungen mit 3-Ap, Py-3-MeC und den als fragliche Intermediärprodukte in Betracht kommenden Substanzen dargestellt wurden, soll eine Zusammenfassung der Ergebnisse bilden:

1). Aus radioaktivem 3-Ap entstehen in Gegenwart von Lebergewebe unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen immer die gleichen Metaboliten. Es sind dies Py-3-MeC und 3-Ac-6-Py. Daneben findet sich eine sehr geringe Menge Ns. Ein bedeutender Teil des eingesetzten 3-Ap bleibt unverändert.

2). Radioaktives Py-3-MeC wird von Lebergewebe nicht abgebaut. Die mittels DC aus den Inkubaten isolierten UV-absorbierenden Substanzen sind keine Stoffwechselprodukte von Py-3-MeC, denn sie sind nicht radioaktiv.

3). (3-Pyridyl-)äthandiol wird in Gegenwart von Lebergewebe in eine Substanz umgewandelt, die nicht identifiziert werden konnte. Ihr Spektrum ähnelt dem von NA, Diol (Ausgangssubstanz) und Glykol-S. Sie hat jedoch einen anderen Rf-Wert als die genannten Verbindungen.

4). Aus ω-Oxyacetylpyridin entstehen nach Inkubation mit Leberhomogenat zwei unbekannte, UV-absorbierende Substanzen. Eine dieser Verbindungen stimmt im Rf-Wert und UV-Spektrum mit Glykol-S überein, während Spektren und Rf-Wert der anderen mit Diol identisch sind.

5). Pyridyl-3-glykolsäure erfährt in Gegenwart von Enzymen aus Rattenleber keine Umsetzungen.

6). Pyridyl-3-glyoxylsäure wird unter der Einwirkung von Lebergewebe und von Darmkeimen zu ca. 10 % in Ns umgewandelt.

D. Die Oxydation von 3-Ap am Ring

Während im vorigen Kapitel die Untersuchungen über Oxydation und Spaltung der Seitenkette von 3-Ap dargestellt wurden, soll im folgenden erörtert werden, auf welche Weise die Oxydation von 3-Ap am Ring, die zu 3-Ac-6-Py führt, verläuft und ob bei dieser Reaktion NM-3-Ac-6-Py die Rolle eines Intermediärproduktes spielt.

Bei der Oxydation des Pyridinringes können das 2-, 4- und 6-Pyridon des 3-Ap entstehen. 3-Ac-6-Py ist von NEUHOFF und HARRIS (37) aus dem Urin von Ratten isoliert und als Stoffwechselprodukt von 3-Ap identifiziert worden. 3-Ac-6-Py trat auch bei unseren Versuchen in vitro regelmäßig auf, wenn 3-Ap mit Rattenleberhomogenat inkubiert wurde. Die Substanz hatten schon früher HARRIS und ÖSTERLE aus Ansätzen mit 3-Ap isoliert. HARRIS (20) nimmt an, daß die im Cytoplasma vorhandene Aldehydoxydase für die Bildung verantwortlich ist. Dem sind Befunde von KNOX (31) entgegenzuhalten, der bei seinen Untersuchungen mit Aldehydoxydase feststellte, daß dieses Enzym, obwohl es N-Methylnikotinamid (NM-NA) rasch oxydiert, NA selbst nicht in nennenswertem Maße in das Pyridon überführt. Die Voraussetzung für das Funktionieren dieses Enzyms scheint erst dann gegeben zu sein, wenn der Pyridinstickstoff in quaternärer Form vorliegt. Nimmt man an, daß in Analogie zum NA 3-Ap erst am Stickstoff methyliert werden muß, ehe eine Oxydation möglich ist, so könnte die Pyridonsynthese über NM-3-Ap und NM-3-Ac-6-Py als Zwischenstufen ablaufen. In Abb. 10 sind sowohl dieser Weg, als auch die direkte Oxydation von 3-Ap ohne vorherige Methylierung skizziert.

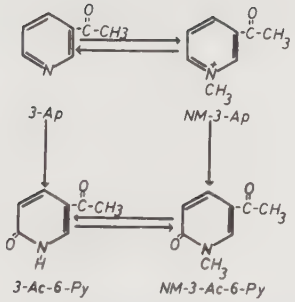


Abb.10 Der mögliche Weg der Pyridonbildung über N-methylierte Zwischenstufen

Einige dieser Reaktionsschritte sind bereits bekannt. So wurde die Methylierung von NA durch CANTONI (10) und die Demethylierung von NM-3-Ap von McKENNIS (34) untersucht.

Um Anhaltspunkte zu gewinnen, ob die Oxydation von 3-Ap zum 6-Pyridon tatsächlich über N-methylierte Zwischenprodukte verläuft, wurden die in Abb. 10 skizzierten Reaktionsschritte in vitro und in vivo untersucht.

1. Versuche mit Aldehydoxydase

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, stellt nach Ansicht von HARRIS (20) die Aldehydoxydase das für die Pyridonsynthese verantwortliche Enzym dar. Durch Untersuchungen von KNOX (31) ist bekannt, daß dieses Ferment NM-NA zu dem entsprechenden 6-Pyridon oxydiert. Es lag daher nahe, zu prüfen, ob in Analogie zum NM-NA auch NM-3-Ap und eventuell auch 3-Ap durch die Aldehydoxydase in ihre Pyridone umgewandelt werden und ob bei dieser Oxydation freies und methyliertes 3-Ap unterschiedlich behandelt werden.
Ein Verfahren, die Aldehydoxydase aus Kaninchenleber rein darzustellen, wurde von HANDLER (19) angegeben. Wir verzichteten für unsere Versuche auf die Isolierung des reinen Enzyms und benutzten nur den ersten Schritt der angegebenen Methode, um eine Fraktion des Cytoplasma abzutrennen, in der die Aldehydoxydaseaktivität vorhanden ist. Um festzustellen, ob die Präparation die wirksame Fraktion enthält, wurde die obengenannte Oxydation von NM-NA durchgeführt. Dabei erwies sich, daß NM-NA von dem aus Kaninchenleber gewonnenen Enzym rasch zum 6-Pyridon oxydiert wird.(s.Methoden V b, 4). Anschließend wurden 3-Ap und NM-3-Ap

unter den gleichen Bedingungen wie NM-NA mit Aldehydoxydase aus Kaninchen- und Rattenleber inkubiert.

Im Küvettenansatz wurde die Extinktionszunahme an der Stelle des UV-Spektrums gegen einen Leerwert gemessen, an der das Pyridin im Gegensatz zum Pyridon keine UV-Absorption besitzt. Diese Punkte liegen für das Reaktionsgemisch 3-Ap 3-Ac-6-Py bei 293 m/u und für NM-3-Ap NM-6-Pyridon bei 285 m/u (Verlauf der Extinktionszunahme pro Zeiteinheit s. Abb. 11 a). Aus der bekannten spezifischen Extinktion der Pyridonverbindungen bei den genannten Wellenlängen läßt sich die pro Zeiteinheit gebildete Menge berechnen. Für die Versuche mit NM-3-Ap ist das Ergebnis in der Tab. 13 zusammengefaßt.

Enzymlösung	NM-3-Ap	NM-3-Ac-6-Py	
		nach 1 Min.	nach 2 Min.
0,1 ml aus Kaninchenleber	600 nMol	157 nMol	252 nMol
0,02 ml "	600 nMol	63 nMol	84 nMol
0,1 ml aus Rattenleber	600 nMol	39 nMol	66 nMol

Tab. 13: Oxydation von NM-3-Ap durch"Aldehydoxydase". In der Tabelle sind der Reihe nach angegeben: Menge der Enzymlösung, die die Ansätze enthielten, Menge des eingesetzten NM-3-Ap und Menge des nach 2 Min. gebildeten NM-3-Ac-6-Py.

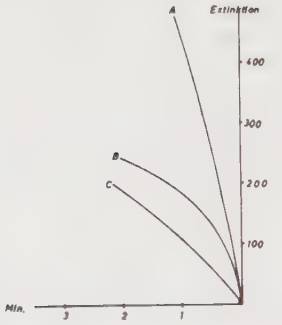


Abb.11a: Extinktionszunahme in Küvettenansätzen mit NM-3Ap bei 285 mμ.
A. 0,1 ml Enzym aus Kaninchenleber
B. 0,02 " " " " "
C. 0,1 " " " Rattenleber

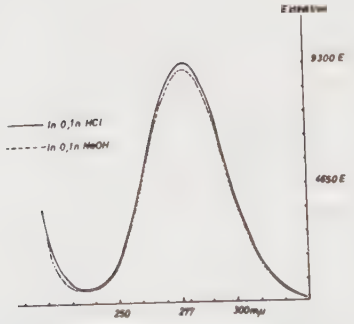


Abb.11b: UV-Spektrum von NM-3-Ac-6-Py

Im Gegensatz zu Ansätzen mit NM-3-Ap erfolgte in Ansätzen, die 3-Ap enthielten, kein Anstieg der Extinktion, gleichgültig, ob Aldehydoxydaselösung aus Ratten- oder Kaninchenleber dazugegeben wurde. Um zu belegen, daß es sich bei dem entstandenen Produkt tatsächlich um NM-3-Ac-6-Py handelt, wurde das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Wie Vorversuche mit reinem NM-3-Ac-6-Py gezeigt hatten, gelingt es, durch einmalige Extraktion mit dem gleichen Volumen Dichlormethan bereits 79 % der Substanz aus wässriger Lösung auszuschütteln. Die Verbindung, die aus den Küvettenansätzen in das organische Lösungsmittel extrahiert wurde, besitzt ein UV-Absorptionsspektrum, das mit dem von synthetischem NM-3-Ac-6-Py übereinstimmt (s.Abb. 11 b). Da diese Substanz aus Ansätzen mit NM-3-Ap stammt, darf angenommen werden, daß es sich tatsächlich um NM-3-Ac-6-Py handelt, das in Gegenwart von Aldehydoxydaselösung aus NM-3-Ap entstanden ist.

Bevor aus den negativen Ergebnissen der Versuche mit 3-Ap der Schluß gezogen wurde, daß die "Aldehydoxydase" nur das N-methylierte 3-Ap zu oxydieren vermag, wurden in weiteren Untersuchungen die Inkubationszeit verlängert sowie die Enzym- und Substratkonzentration heraufgesetzt. Ein Ansatz mit 20 µMol radioaktivem 3-Ap und 3,0 ml Enzymlösung aus Rattenleberzellen wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach dem Hitzedenaturieren und Zentrifugieren wurde ein aliquoter Teil des Überstandes auf DC-Platten mit Flm. V chromatographiert. Die UV-absorbierende, radioaktive Substanz, die sich im DC an der Stelle des 3-Ac-6-Py-Tests befand, wurde eluiert und in Flm. IV rechromatographiert. Auch in diesem Flm. entsprach ihr chromatographisches Verhalten dem von 3-Ac-6-Py. Ein weiterer Beleg, daß es sich bei der Verbindung um 3-Ac-6-Py handelt, stellt die Übereinstimmung des UV-Spektrums mit authentischem 6-Pyridon dar.

Die Menge des isolierten 3-Ac-6-Py betrug 326 nMol. Eine Wiederholung des Versuchs führte zu dem gleichen Ergebnis.

Daraus ergibt sich, daß in der Enzympräparation ein Faktor enthalten ist, der auch die Oxydation des nicht methylierten 3-Ap zum 6-Pyridon katalysiert. Ob es sich dabei um die Aldehydoxydase oder um ein anderes Enzym handelt, bleibt vorerst ungeklärt. Offenkundig ist die Oxydationsgeschwindigkeit von 3-Ap relativ klein im Verhältnis zu der Geschwindigkeit, mit der NM-3-Ap oxydiert wird.

2. Die Pyridonsynthese in Gegenwart von Leberhomogenat

Die Untersuchungen mit"Aldehydoxydase" zeigten, daß das methylierte 3-Ap bevorzugt zum Pyridon oxydiert wird. Wenngleich das am Stickstoff nicht methylierte 3-Ap ebenfalls oxydiert wird, läßt es dieser Befund dennoch als möglich erscheinen, daß der Hauptweg der Pyridonbildung über N-methylierte Intermediärprodukte verläuft. In diesem Falle müßte es gelingen, aus Inkubaten von 3-Ap NM-3-Ap und NM-3-Ac-6-Py zu isolieren. Um dies zu prüfen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

I. Versuche mit 3-Ap

Radioaktives 3-Ap wurde in Gegenwart von Rattenleberhomogenat inkubiert mit dem Ziel, aus den Inkubaten 3-Ac-6-Py, NM-3-Ac-6-Py und NM-3-Ap abzutrennen [1].

---

1) Der Ansatz Nr.I enthielt das Homogenat von 5 g Rattenleber und 30 mg 3-Ap. Bei einem Gesamtvolumen von 33 ml betrug die Konzentration von 3-Ap $7{,}5 \cdot 10^{-3}$ M. (Forts. s. folg. S.)

I. Die Isolierung des entstandenen 3-Ac-6-Py erfolgte durch Papierchromatographie. Die Substanz wurde im Chromatogramm nach der Lage des mitchromatographierten authentischen Produktes und durch ihr typisches UV-Absorptionsspektrum identifiziert (s.Abb. 12). Aus der gemessenen Extinktion und der bekannten spezifischen Extinktion läßt sich berechnen, daß in den drei untersuchten Ansätzen pro ml 257, 352 bzw. 375 nMol 3-Ac-6-Py entstanden sind. Das bedeutet, daß im Mittel 4,2 % des eingesetzten 3-Ap zu 3-Ac-6-Py in Gegenwart von Leberhomogenat oxydiert wurden.

II. Im Anschluß daran wurde versucht, NM-3-Ap aus den Inkubaten zu isolieren. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten: 1. Chromatographische Trennung auf DC-Platten in Flm. VIII. In diesem Flm. besitzt NM-3-Ap einen Rf-wert von 0,27 und trennt sich damit von 3-Ap, Py-3-MeC und 3-Ac-6-Py ab. 2. Papierhochspannungselektrophorese

---

Die Reaktion im Ansatz wurde nach 60 Min. durch Zugabe von 300 ml heißem Äthanol unterbrochen. Durch Zentrifugation wurde das denaturierte Gewebe abgetrennt. Der Überstand wurde dekantiert und auf 36 ml eingeengt. Davon wurde 1 ml zur Papierchromatographie in Flm.IV aufgetragen. Das entstandene 3-Ap-6-Py wurde in 5,0 ml 0,1 n HCl eluiert und darin die UV-Absorption gemessen. Diese betrug bei 275 m/u 610 E.

Die Ansätze Nr. II und III setzten sich genau so zusammen wie Ansatz Nr.I, wobei das Gesamtvolumen jedoch auf 6,6 ml reduziert war. Die Konzentration von 3-Ap im Ansatz betrug ebenfalls $7{,}5 \cdot 10^{-3}$M. Die Reaktion wurde durch Zugabe des 10-fachen Volumens von heißem Äthanol gestoppt. Der erhaltene Überstand wurde diesmal auf 10 ml eingeengt, wovon 1,0 ml zur Papierchromatographie aufgetragen wurden. In 5,0 ml 0,1 n HCl betrug die Extinktion für 3-Ac-6-Py 600 bzw. 640 E.

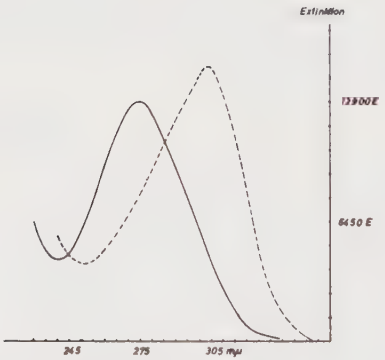


Abb. 12: UV-Spektrum von 3-Ac-6-Py
——— in 0,1n HCl
- - - - - - in 0,1n NaOH

unter den unten angegebenen Bedingungen+). Wir versuchten die Substanz nach beiden Verfahren zu isolieren.

1. D C : Ein aliquoter Teil der Ansätze mit 3-Ap wurde zur DC in Flm. VIII aufgetragen. Im Anschluß an die Chromatographie konnte jedoch an der Stelle des DC, an der sich eventuell entstandenes NM-3-Ap hätte befinden müssen, weder UV-Absorption noch Radioaktivität registriert werden.

2. Elektrophorese: Um die Möglichkeit auszuschließen, daß NM-3-Ap nur in äußerst geringen Mengen auftritt, die durch die angewendete Methode nicht erfaßt werden, wurden die Überstände von zehn weiteren Ansätzen nach dem Denaturieren vereinigt und das Volumen am Rotationsverdampfer auf ein Zehntel der ursprünglichen Menge eingeengt. Dieses Konzentrat wurde zur Papierelektrophorese aufgetragen. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Papierstreifen unter dem Gasflußzählrohr auf Radioaktivität untersucht. An der Stelle, wo NM-3-Ap zu erwarten wäre, fand sich weder UV-Absorption noch Radioaktivität. Daraus geht hervor, daß in unseren Versuchen mit Leberhomogenat NM-3-Ap als Metabolit von 3-Ap nicht nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung von McKENNIS (34) überein, der nach Gabe von 3-Ap niemals NM-3-Ap als Metabolit fand.

+) Phosphatpuffer (0,03 M) von pH 6,6, Spannung 1,0 KV, Entfernung der Auftragstelle von den Polen 21 cm. In 30 Min. wanderte NM-3-Ap 9,4 cm. in Richtung auf die Kathode.

III. Die dritte Verbindung, die wir aus den Ansätzen mit 3-Ap zu isolieren versuchten, war NM-3-Ac-6-Py. In Vorversuchen wurde ein Verfahren ausgearbeitet, mit dem es gelingt, NM-3-Ac-6-Py aus Inkubaten abzutrennen. Der alkoholische Gewebsextrakt der Inkubate wurde zur Trockne eingeengt und anschließend in 0,1 n HCl gelöst. Die salzsaure Lösung wurde zweimal mit dem doppelten Volumen Dichlormethan extrahiert. Auf diese Weise ist es möglich, 90 % der Substanz in das organische Lösungsmittel zu überführen. Allerdings werden auch 20 % des 3-Ac-6-Py und Spuren des 3-Ap mit Dichlormethan ausgeschüttelt. 3-Ap ist eine flüchtige Substanz und kann deshalb eliminiert werden, wenn man das Dichlormethan im Rotationsverdampfer entfernt und den Rückstand über Nacht im Exsikkator unter Vakuum aufbewahrt. Die Trennung der beiden Pyridonverbindungen gelingt durch DC in Flm. VII. Die Rf-Werte sind bei der "Sandwich"-Methode ziemlich konstant und betragen bei 14 cm Trennstrecke 0,64 für NM-3-Ac-6-Py und 0,78 für 3-Ac-6-Py (s.Abb.13).

Ein aliquoter Teil der alkoholischen Extrakte der Ansätze mit 3-Ap wurde in der oben beschriebenen Weise behandelt. Nach Eindampfen des organischen Lösungsmittels und Auflösen des Rückstandes in Äthanol, wurde dieser quantitativ zur DC in Flm.VII aufgetragen. Die Stelle im DC, an der sich eventuell entstandenes NM-3-Ac-6-Py befinden müßte, war durch gleichzeitig chromatographiertes, synthetisches NM-3-Ac-6-Py markiert. An dieser Stelle war keine UV-Absorption sichtbar, aber das RD zeigte einen geringen Radioaktivitätspeak. Um zu prüfen, ob die Aktivität tatsächlich von einer Spur NM-3-Ac-6-Py herrührte, wurde das Kieselgel in diesem Bereich herausgekratzt und mit Methanol eluiert. Der Methanol wurde eingeengt und zusammen mit inaktivem NM-3-Ac-6-Py zur DC in Methyläthylketon

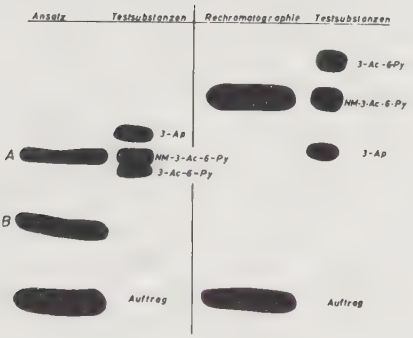


Abb 13: Isolierung von NM-3-Ac-6-Py
links: DC des Inkubates mit NM-3-Ac-6-Py (A)
Substanz B stammt aus dem Gewebe.
Flm. I
rechts: Rechromatographie von A in Flm. VII.

aufgetragen. Im Anschluß an die Chromatographie wurde das RD aufgezeichnet. Die registrierte, geringe Aktivität befindet sich nicht über dem Flecken im DC, der NM-3-Ac-6-Py entspricht.

Nach der Inkubation von 3-Ap findet man unter den Bedingungen in vitro NM-3-Ac-6-Py nicht als Metabolit des 3-Ap.

II. Versuche mit NM-3-Ap

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß aus 3-Ap in vitro nur freies 6-Pyridon entsteht, war es interessant zu untersuchen, ob aus NM-3-Ap in Gegenwart von Leberhomogenat methyliertes und nichtmethyliertes 6-Pyridon gebildet werden kann. Bei den entsprechenden Versuchen enthielten zwei Ansätze je 6 mg NM-3-Ap (in 1 ml Inkubationsmedium gelöst) plus 4 ml Homogenat. Die Substratkonzentration betrug $8,9 \cdot 10^{-3}$M. Nach 60 Min. wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 100°C gestoppt. Das denaturierte Gewebe wurde abzentrifuriert. Danach wurden die Überstände beider Ansätze vereinigt, zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 1,0 ml Wasser gelöst. Davon wurden je 0,2 ml auf drei DC-Platten aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte in Flm.I, dabei trennten sich zwei UV-absorbierende Flecken ab. Der frontnahe befand sich in Höhe des als Test aufgetragenen NM-3-Ac-6-Py. Der startnahe Fleck tritt auch auf, wenn der Überstand von denaturiertem Gewebe ohne Substrat chromatographiert wird. Es handelt sich also um eine Substanz, die im Homogenat vorhanden ist. Die Verbindung im Bereich des NM-3-Ac-6-Py-Tests wurde eluiert und in Flm. VII rechromatographiert. Dabei erweist sich die in dem Fleck enthaltene Substanz als einheitliches NM-3-Ac-6-Py. Freies Pyridon trennt sich daraus nicht ab. Auch 3-Ap wurde im DC nicht nachgewiesen.

Man findet demnach bei Versuchen mit Leberhomogenat als einzigen Metaboliten des NM-3-Ap das N-methylierte 6-Pyridon.

Um die Pyridonbildung aus 3-Ap und NM-3-Ap vergleichen zu können, wurde in weiteren Versuchen geprüft, wieviel Prozent des eingesetzten NM-3-Ap oxydiert werden.

Zwei Ansätze mit je 49 µMol NM-3-Ap und 6 ml Leberhomogenat wurden dazu 60 Min. bei 37°C inkubiert. Das Volumen der Ansätze betrug 6,6 ml. Die Konzentration des NM-3-Ap betrug $7,4 \cdot 10^{-3}$ M. Die Isolierung von NM-3-Ac-6-Py erfolgte in der auf S.86 unter Fußnote 1 beschriebenen Weise. Die Lage des NM-3-Ac-6-Py im Chromatogramm wurde durch gleichzeitig chromatographierte Reinsubstanz markiert. Die neben der Testsubstanz befindlichen Flecken UV-absorbierender Substanz wurden mit 5 ml 0,1 n HCl eluiert. Anschließend wurde das Spektrum der Substanz aufgezeichnet. Es stimmt mit dem von synthetischen NM-3-Ac-6-Py überein. Am Maximum bei 277 mµ betrug die Extinktion für NM-3-Ac-6-Py aus den beiden Ansätzen 2010 bzw. 2895 Extinktionseinheiten. Daraus errechnet sich die Menge des entstandenen Pyridon zu 1,63 bzw. 2,20 µMol pro ml der Ansätze; d.h. ca. 22 bzw. 30 % des eingesetzten NM-3-Ap sind durch Enzyme, die im Leberhomogenat enthalten sind, zu NM-3-Ac-6-Py oxydiert worden. Ein Vergleich mit dem Prozentsatz des 3-Ap, der ins Pyridon überführt wird (s.S. 87) zeigt, daß von der am Stickstoff methylierten Verbindung 5 bis 7 mal mehr zum 6-Pyridon oxydiert wird als vom nicht methylierten 3-Ap.

Dieser Befund stimmt mit dem Ergebnis der Versuche mit "Aldehydoxydase" überein, aus denen hervorging, daß die am Stickstoff methylierten Pyridinverbindungen bei der Oxydation bevorzugt werden.

III. Untersuchungen mit NM-3-Ac-6-Py

Aus den Untersuchungen von NEUHOFF und HARRIS (37) über die Pyridonbildung ging hervor, daß in vivo aus 3-Ap beide Pyridonderivate entstehen, während bei unseren Versuchen in vitro nur das Pyridon gebildet wird, das der jeweils eingesetzten Verbindung entspricht. Diese Diskrepanz läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß erstens 3-Ap in vitro nicht in nennenswertem Umfang methyliert wird, wie die vorangehenden Untersuchungen ja gezeigt haben, und daß zweitens NM-3-Ac-6-Py bei diesen Experimenten nicht demethyliert wird. Um zu untersuchen, ob die zweite Annahme berechtigt ist, wurden Versuche mit NM-3-Ac-6-Py durchgeführt. Die Ansätze enthielten bei einem Volumen von 6 ml NM-3-Ac-6-Py in den Konzentrationen $6{,}6 \cdot 10^{-3}$M , $7{,}95 \cdot 10^{-3}$ und $1{,}32 \cdot 10^{-2}$M plus 5 ml Leberhomogenat. Die Inkubation erfolgte wiederum 1 Std. bei 37°C. Nach dem Denaturieren und Zentrifugieren wurde der Überstand der Inkubate zur Trockne eingeengt und der Rückstand in einer kleinen Menge Wasser gelöst. Diese wurde quantitativ zur DC in Flm. I und Flm. VII aufgetragen. Die Chromatogramme zeigten in Höhe des als Leitsubstanz gleichzeitig aufgetragenen synthetischen NM-3-Ac-6-Py einen UV-absorbierenden Flecken. Die dort befindliche Substanz wurde durch ihr Spektrum als unverändertes NM-3-Ac-6-Py identifiziert. Eine weitere UV-absorbierende Substanz, die in Flm. I einen Rf-Wert von 0,29 besitzt, findet sich auch, wenn der Überstand aus Inkubaten von Gewebe ohne Substrat chromatographiert wird. Weitere UV-absorbierende Stoffe wurden aus den Ansätzen nicht isoliert, ein Beweis dafür, daß NM-3-Ac-6-Py unter den eingehaltenen Bedingungen nicht in erkennbarem Umfang demethyliert wird.

3. Vergleichende Untersuchung der Pyridonbildung aus 3-Ap und NM-3-Ap in vivo

Die bisher in vitro durchgeführten Versuche zur Pyridonbildung haben ergeben, daß 3-Ap-6-Py nur aus 3-Ap und NM-3-Ac-6-Py nur aus NM-3-Ap entsteht. Dabei wird das N-Methyl-Derivat bevorzugt oxydiert. In vivo fanden dagegen NEUHOFF und HARRIS (37) nach 3-Ap-Gabe 3-Ac-6-Py und daneben eine kleine Menge Methyl-Pyridon. Wenn man annimmt, daß die Oxydation obligat über NM-3-Ap verläuft, wie es in der Einleitung diskutiert wurde, dann müßte das entstandene NM-3-Ac-6-Py rasch demethyliert werden, um das mengenmäßige Überwiegen des nicht methylierten Pyridons zu erklären. In diesem Falle würde in vivo auch nach Applikation von NM-3-Ap in der Hauptsache freies Pyridon auftreten. Um experimentelle Hinweise für oder gegen diese Annahme zu erhalten, untersuchten wir in vergleichenden Experimenten die Pyridonausscheidung im Urin nach Gabe von 3-Ap einerseits und NM-3-Ap andererseits. Dazu wurde einer Gruppe von zwei weiblichen Ratten radioaktives 3-Ap und einer anderen Gruppe von vier weiblichen Ratten radioaktives NM-3-Ap intraperitoneal appliziert. Zur Steigerung der Diurese erhielten die Tiere gleichzeitig 10 ml physiologische Kochsalzlösung subcutan. Sie wurden über Nacht in einem Stoffwechselkäfig gehalten, der es erlaubte, Fäces und Urin getrennt zu sammeln.

I. Versuche mit 3-Ap

Zwei Tiere erhielten zusammen 38,2 mg 3-Ap, entsprechend einer Dosis von 60 mg/kg, mit einer Radioaktivität von 181 uC. Die Tiere produzierten 39,5 ml Urin. Diese Menge wurde auf pH 9,0 eingestellt und mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die gesuchten Verbindungen

3-Ac-6-Py und NM-3-Ac-6-Py lassem sich unter diesen Bedingungen , wie Vorversuche gezeigt haben, weitgehend in das Dichlormethan überführen. Das organische Lösungsmittel wurde auf 1 ml eingeengt. Davon wurde die Hälfte zur Papierchromatographie in Flm.IV aufgetragen. Bei der Chromatographie erhält man fünf von einander getrennte, UV-absorbierende Flecken, über denen Radioaktivität registriert wurde. Die Substanzen an diesen Stellen wurden mit Methanol eluiert und mit Butylalkohol als Fließmittel rechromatographiert. Dabei erwiesen sich die Flecken 1 - 4 als einheitlich, während sich aus dem fünften Fleck die Verbindungen 5a und 5b von einander trennten. Es gelang, einige der isolierten Stoffe durch ihre Lage im Chromatogramm und ihr UV-Absorptionsspektrum zu identifizieren.

Alle sechs Verbindungen, die in den Flecken enthalten waren, wurden mit dem gleichen Volumen 0,1 n HCl eluiert. Die Radioaktivität und die Extinktion am Absorptionsmaximum wurden für alle Substanzen unter den gleichen Bedingungen gemessen. Die dabei gefundenen Werte sind in Tab. 14 angegeben.

Fleck-Nr.	Substanz	Radioaktivität	UV-Absorption
1	Py-3-MeC	3,24 /uC	n. gem.
2	NM-3-Ac-6-Py	0,16 /uC	4.950 E
3	?	0,43 /uC	n. gem.
4	?	0,24 /uC	n. gem.
5 a	3-Ac-6-Py	0,93 /uC	12.475 E
5 b	?		

Tab. 14: Radioaktivität und UV-Absorption der aus Urin isolierten Metaboliten des 3-Ap.

II. Versuche mit NM-3-Ap

Bei diesem Versuch erhielten die Tiere radioaktives NM-3-Ap in einer Dosis von 144 mg/kg. Insgesamt wurden 127 mg NM-3-Ap mit einer Radioaktivität von 294 µC injiziert. Die Aufarbeitung erfolgte wie im Versuch mit 3-Ap. Im Anschluß an die Chromatographie erhält man ebenfalls fünf radioaktive Flecken, die jedoch nur zum Teil mit denen aus Versuch I identisch sind. Die Substanz, die dem Fleck 1 im Chromatogramm entspricht, wurde durch Rf-Wert und Spektrum als NM-3-Ac-6-Py und die Substanz, die in Fleck 3 enthalten war, als 3-Ac-6-Py identifiziert. Die Werte für Radioaktivität und UV-Absorption der einzelnen Metaboliten sind in der Tab. 15 zusammengestellt.

Fleck-Nr.	Substanz	Radioaktivität	UV-Absorption
1	NM-3-Ac-6-Py	0,75 µC	16.400 E
2	?	0,24 µC	n. gem.
3	3-Ac-6-Py	0,12 µC	1.680 E
4	?	0,02 µC	n. gem.
5	?	0,15 µC	n. gem.

Tab. 15: Radioaktivität und UV-Absorption der aus Urin isolierten Metaboliten von NM-3-Ap.

Die vergleichenden Versuche mit 3-Ap und NM-3-Ap führten zu folgendem Ergebnis: Aus beiden Verbindungen entstehen sowohl nicht methyliertes als auch methyliertes 6-Pyridon. An Hand der Radioaktivität kann man berechnen, daß im Versuch mit 3-Ap 5,1 °/oo der Substanz zu 3-Ac-6-Py und 0,9 °/oo zu NM-3-Ac-6-Py oxydiert wurden. Ist dagegen unter gleichen Bedingungen NM-3-Ap die Ausgangssubstanz, so findet man, daß 2,5 °/oo des NM-3-Ap zu methyliertem Pyridon und nur 0,4 °/oo zu freiem Pyridon oxydiert wurden. D.h. während aus 3-Ap mehr nicht methyliertes Pyridon entsteht, wird aus NM-3-Ap mehr methyliertes Pyridon gebildet.

Diskussion

Der Abbau des 3-Ap erfolgt durch oxydative Prozesse, die sich teilweise am Ring und teilweise an der Seitenkette abspielen. Da es sich um unterschiedliche Reaktionswege mit verschiedenen Zwischenprodukten handelt, sollen erst die Ergebnisse der Nikotinsäurebildung und dann die der Pyridon-oxydation besprochen werden.

Die oxydativen Veränderungen an der Seitenkette, die zu Py-3-MeC und weiter zu Ns bzw. NA führen, sind von verschiedenen Autoren untersucht worden. BEHER u.a. (1-5) isolierten aus dem Urin von Hunden, NEUHOFF u.a. (37, 38) fanden im Harn von Ratten NA und dessen Derivate als Abbauprodukte des verabfolgten 3-Ap. Die Angaben des prozentualen Anteils von 3-Ap, der in Ns bzw. NA umgewandelt wird, differieren je nach Versuchstier erheblich. So gibt BEHER (3) an, daß 20 - 30 % zu NA umgewandelt werden, während NEUHOFF nur von 1 - 2 % spricht, die er als Derivate des NA isolieren konnte. Aus den Nukleotiden des Gehirns von Ratten isolierte NEUHOFF (39) ^{14}C-NA in einer Menge, die nur 0,006 % des applizierten 3-Ap entsprach. Bei den eigenen Versuchen wurden unveränderte Ns und NA aus den Kadavern von Ratten isoliert. Der Anteil der aus 3-Ap entstandenen Ns betrug 1 ‰, der des NA 1 %. Übereinstimmend mit NEUHOFF kann man sagen, daß die Bildung von Ns für den Abbau des 3-Ap zumindest im Organismus der Ratte eine untergeordnete Rolle spielt.

Der wichtigste Metabolit ist Py-3-MeC. Fünf Stunden nach Applikation von 3-Ap wurden aus den Tierkadavern 55 % der eingesetzten Radioaktivität als Py-3-MeC isoliert. Entsprechend fanden KANIG und KORANSKY (25),

daß 56 % der Radioaktivität, die sie nach Gabe von tritiiertem 3-Ap zum gleichen Zeitpunkt aus dem Gehirn von Ratten isolierten, in Form des Py-3-MeC vorlagen. NEUHOFF (38, 40), der die 3-Ap-Metaboliten aus Rattenurin erhielt, stellte fest, daß Py-3-MeC zusammen mit seinen glukuronidierten und am Stickstoff oxydierten Derivaten mit 50 - 56 % das Hauptstoffwechselprodukt des 3-Ap ist. Allerdings fallen nur 4 - 5 % auf unverändertes Methylcarbinol. Offenbar entstehen aus Py-3-MeC stark polare Derivate, die wahrscheinlich unwirksam sind und rasch über die Nieren ausgeschieden werden. Daher glaubt NEUHOFF (40) im Gegensatz zu KANIG und KORANSKY (25) nicht an eine Beteiligung des Py-3-MeC an der 3-Ap-Vergiftung. Die Auffassung von KANIG und KORANSKY wird durch die eigenen Befunde gestützt, denn auf dem Höhepunkt der Vergiftung konnten 55 % der als 3-Ap verabfolgten Radioaktivität als freies Py-3-MeC aus den Organen isoliert werden. Entgegen der Annahme von NEUHOFF könnte Py-3-MeC durchaus an der 3-Ap-Vergiftung beteiligt sein, denn die Menge der im Urin auftretenden, untoxischen Metaboliten gestattet keinen Rückschluß auf die aktuelle Konzentration des Giftstoffes am Höhepunkt der Intoxikation. Allerdings muß erwähnt werden, daß möglicherweise durch eine umkehrbare Reaktion im Organismus aus Py-3-MeC 3-Ap entsteht. Jedenfalls geht aus unseren Experimenten hervor, daß sechs Stunden nach Gabe von Py-3-MeC 5,3 % der verabfolgten Radioaktivität als 3-Ap vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt wurden noch 43 % des Py-3-MeC in unveränderter Form isoliert. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die nach Gabe von reinem Methylcarbinol im Organismus vorhandene geringe Menge 3-Ap allein das schwere Vergiftungsbild auslöst, das in den eigenen Experimenten erst nach Injektion von 3-Ap in einer

Dosis von 80 mg/kg hervorgerufen wurde. Dabei konnten im Gewebe nach fünf Stunden noch 22 % der Radioaktivität in Form des unveränderten 3-Ap isoliert werden.

Wir bemühten uns, außer dem Py-3-MeC noch weitere Zwischenprodukte des Abbaus von 3-Ap zu Ns aufzufinden. Dabei orientierten wir uns an dem von McKENNIS (35) aufgestellten Schema, in dem Py-3-MeC und Pyridinäthandiol als die beiden ersten Intermediärsubstanzen rangieren.
Nach Gabe von Py-3-MeC registrierte BEHER (4) eine erhöhte Ausscheidung von NM-NA im Urin von Hunden wie nach 3-Ap.
Aus den eigenen Untersuchungen über den Abbau von tritiertem Py-3-MeC in vivo ging hervor, daß auch nach Applikation dieser Verbindung in den Geweben radioaktives NA und Ns auftreten. Die Radioaktivität, die auf diese Stoffe entfällt, beträgt 1 - 2 % der als Carbinol eingesetzten. Da aus Py-3-MeC auch 3-Ap gebildet wird, ist es möglich, daß Ns und NA auf dem Umweg über 3-Ap und nicht direkt aus Py-3-MeC entstanden sind. Allerdings entstehen aus Py-3-MeC mehr NA und Ns als aus 3-Ap. Dies ist verständlich, wenn man mit McKENNIS (35) annimmt, daß das Py-3-MeC bereits die erste Stufe auf dem Wege zu Ns darstellt.

Die in vitro durchgeführten Untersuchungen erlauben es nicht, eindeutig zu der Hypothese von McKENNIS Stellung zu nehmen. Als einzige der von diesem Autor angenommenen Zwischenprodukte wurde Py-3-MeC gefunden. Bei Inkubation mit Leberhomogenat unter den gewählten Bedingungen wird Py-3-MeC jedoch nicht weiter verändert. Dieses Ergebnis bringt daher keine Erklärung für die in vivo beobachteten Umsetzungen der Verbindungen zu NA und Ns.

Von den übrigen in die Versuche eingesetzten Substanzen wurde nur Pyridyl-3-glyoxylsäure zu Ns abgebaut. Aus ω-Oxyacetylpyridin entstehen Verbindungen, bei denen es sich möglicherweise um das Diol und Pyridyl-3-glykolsäure handelt. Py-3-MeC ist demnach wahrscheinlich nicht das erste Glied der Reaktionskette, die von 3-Ap zu Ns führt, da es offenbar sehr rasch durch konkurrierende Reaktionen in Endprodukte seines Stoffwechsels z.B. Py-3-MeC-Glukuronid überführt wird. Dagegen scheint es denkbar, daß dem Ketol eine zentrale Rolle beim Abbau des 3-Ap zukommt. Diese Verbindung mit der Ketoalkoholgruppe als Seitenkette kann durch Hydroxylierung des endständigen C-Atoms aus 3-Ap entstehen. Durch weitere Hydrierung könnte aus Ketol das Diol von McKENNIS oder durch entsprechende Oxydation die Pyridyl-3-glyoxylsäure gebildet werden. Von der zuletzt genannten Verbindung wurde in den eigenen Untersuchungen gezeigt, daß sie in Ns überführt werden kann. Ob diese Reaktion analog der Brenztraubensäuredekarboxylierung abläuft, ist nicht sicher, denn der Zusatz von Thiaminpyrophosphat zu Inkubaten mit Glyoxyl-S ließ keinen Einfluß auf die Ns-Bildung erkennen. Jedenfalls könnte das radioaktive CO_2, das BEHER (5) nach Gabe von ^{14}C-markiertem 3-Ap in der Ausatemluft fand, aus der Dekarboxylierung der Glyoxylsäure stammen. BEHER (5) gibt noch einen Hinweis für einen anderen Entstehungsweg der Ns, bei dem die Serin-hydroxymethylase eine Rolle spielen könnte. Dieses Enzym überträgt endständige Kohlenstoff-Sauerstoff-Gruppen auf Glycin unter Bildung von Serin (43). Als Donatoren einer übertragbaren C_1-Gruppe kämen Diol, Ketol oder die entsprechenden Aldehyde dieser Verbindungen in Betracht. Während die Dekarboxylierung von Glykol-S experimentell belegt werden konnte, geben

unsere Versuche jedoch keinen Hinweis auf die Mitwirkung der Serinhydroxymethylase bei der Entstehung von Ns.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte durch die Untersuchung der Pyridonbildung der Frage nachgegangen werden, auf welchem Wege diese Verbindungen entstehen und ob N-methylierte Zwischenstufen dabei eine Rolle spielen. Die durchgeführten Experimente erlauben jedoch keine endgültige Beantwortung dieser Frage.

Die Versuche in vivo haben ergeben, daß aus 3-Ap im wesentlichen nicht methyliertes 6-Pyridon entsteht, während NM-3-Ap hauptsächlich zu NM-3-Ac-6-Py oxydiert wird. Dieser Befund deutet darauf hin, daß eine direkte Oxydation des 3-Ap stattfindet und daß die vorherige Methylierung am Stickstoff nicht Voraussetzung für die Umwandlung in das Pyridon ist. Das Auftreten von NM-3-Ac-6-Py im Versuch mit 3-Ap und von 3-Ac-6-Py im Versuch mit NM-3-Ap als Ausgangsmaterial zeigt, daß eine Überführung der nicht methylierten Verbindungen in die methylierten und umgekehrt möglich ist, wobei nicht entschieden werden konnte, ob diese Umwandlung auf der Stufe der Ausgangsstoffe oder der Oxydationsprodukte abläuft.

Daß sich die genannten Reaktionen neben- und nacheinander abspielen, ist tatsächlich denkbar, denn die Methylierung von Pyridinverbindungen wurde von CANTONI (10) am Beispiel des NA, die Demethylierung des NM-3-Ap von McKENNIS (34) und die Oxydation des NM-3-Ap von KAPLAN (29) beschrieben. Dagegen ist noch nicht geklärt, welches Enzym 3-Ap direkt in das 6-Pyridon überführt. HARRIS (20) vermutet, daß es sich dabei um die Aldehydoxydase handelt. Unsere Versuche mit einer

Gewebefraktion, die Aldehydoxydase enthielt, zeigten, daß praktisch keine Umwandlung des 3-Ap zum Pyridon stattfindet. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund von KNOX (31) überein, der feststellte, daß Aldehydoxydase NM-NA nicht aber NA zu oxydieren vermag. In Gegenwart von Leberhomogenat oder von Supernatant kommt es dagegen zur Pyridonbildung, so daß erwogen werden muß, daß die Aldehydoxydase bei der Oxydation nicht methylierter Pyridinverbindungen der Mitwirkung cytoplasmatischer Faktoren bedarf, wie sie von HANDLER (19) diskutiert wurden.

Wenn auch nicht festgestellt werden konnte, welches Enzym 3-Ap oxydiert, so sprechen unsere Befunde doch dafür, daß die Pyridonbildung ohne Zwischenschaltung N-methylierter Intermediärprodukte abläuft, denn bei den in vitro durchgeführten Versuchen entstand aus 3-Ap immer nur 3-Ac-6-Py und aus NM-3-Ap nur NM-3-Ac-6-Py. In keinem Falle konnte eines der postulierten Zwischenprodukte isoliert werden.

Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird untersucht, welche Zwischenprodukte beim Abbau von 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-Methylcarbinol zu Nikotinsäure auftreten.

In die Versuche wird zunächst käufliches 3-Acetylpyridin als Substrat eingesetzt. Dabei stellt sich heraus, daß das Präparat zwei Verunreinigungen enthält, aus denen bei Inkubation mit Leberhomogenat Nikotinsäure entsteht. Es gelingt, einen der Begleitstoffe als Nikotinsäurebutylester zu identifizieren. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, bei den folgenden Experimenten mit dünnschichtchromatisch gereinigtem 3-Acetylpyridin zu arbeiten.

Radioaktives 3-Acetylpyridin wird Ratten intraperitoneal verabreicht. Nach fünf Stunden werden aus den Kadavern der Tiere 54 % der eingesetzten Radioaktivität in Form von Pyridin-3-Methylcarbinol, 1 % in Form von Nikotinamid und 0,03 % als Nikotinsäure isoliert. 21 % des 3-Acetylpyridin werden unverändert gefunden.

Entsprechende Versuche mit Pyridin-3-Methylcarbinol als Ausgangsmaterial ergeben, daß 5,4 % der Substanz in 3-Acetylpyridin, 0,3 % in Nikotinamid und 0,13 % in Nikotinsäure umgewandelt wurden. 42,8 % des eingesetzten Pyridin-3-Methylcarbinol werden in unveränderter Form isoliert.

Die Inkubation von 3-Acetylpyridin mit Leberhomogenat liefert 0,07 °/oo Nikotinsäure. Zusatz einer Reihe von Cofermenten zu den Inkubaten beeinflußt die Reaktion nicht.

Anschließend wird der Abbau von Pyridin-3-Methylcarbinol, Pyridyl-3-glyoxylsäure und anderen Verbindungen, die möglicherweise Zwischenprodukte auf dem Wege von 3-Acetylpyridin zu Nikotinsäure darstellen, in Gegenwart von Leberhomogenat untersucht. Von diesen Substanzen wird nur Pyridyl-3-glyoxylsäure in Nikotinsäure umgewandelt. Aus ω-Oxyacetylpyridin entstehen zwei UV-absorbierende Verbindungen, deren Identifizierung jedoch nicht gelang.

Die Bedeutung von Pyridin-3-Methylcarbinol beim Zustandekommen der 3-Acetylpyridin-Vergiftung wird diskutiert und die Frage aufgeworfen, ob dem ω-Oxyacetylpyridin eine zentrale Stellung beim Abbau von 3-Acetylpyridin zukommt.

Im zweiten Teil der Arbeit wird untersucht, ob die Oxydation von 3-Acetylpyridin zu 3-Acetyl-6-Pyridon eventuell über NM-Methyl-3-Acetylpyridin und N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon verläuft.

Aus den Experimenten geht hervor, daß N-Methyl-3-Acetylpyridin sowohl durch eine Gewebefraktion, die Aldehydoxydaseaktivität enthält, als auch durch Leberhomogenat in weit größerem Umfange als nicht methyliertes 3-Acetylpyridin oxydiert wird. Bei Versuchen *in vitro* entsteht aus 3-Acetylpyridin nur 3-Acetyl-6-Pyridon und aus N-Methyl-3-Acetylpyridin nur N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon, während *in vivo* jeweils beide Pyridone nebeneinander gebildet werden. Dabei findet man nach Gabe von Methyl-3-Acetylpyridin überwiegend methyliertes 6-Pyridon.

Diese Befunde sprechen gegen die Annahme, daß die Pyridonbildung obligat über methylierte Zwischenstufen vor sich geht. Falls die Aldehydoxydase tatsächlich 3-Acetylpyridin zu oxydieren vermag und nicht noch andere Enzyme beteiligt sind, bedarf sie wohl der Mitwirkung noch unbekannter Kofaktoren.

Verzeichnis der Abkürzungen

3-Ac-6-Py	3-Acetyl-6-Pyridon
3-Ap	3-Acetylpyridin
DC	Dünnschichtchromatographie
Diol	(3-Pyridyl)-1,2-äthandiol
Flm.	Fließmittel für Chromatographie
Glykol-S	Pyridyl-3-glykolsäure
Glyoxyl-S	Pyridyl-3-glyoxylsäure
Ipm	Impulse pro Minute
Ketol	ω-Oxyacetylpyridin
-MJ	-Methyljodid
NA	Nikotinamid
NAD	Nikotinamiddinukleotid
NADP	Nikotinamiddinukleotidphosphat
NA-6-Py	Nikotinamid-6-Pyridon
NM-	N-Methyl-
Ns	Nikotinsäure
NsBuE	Nikotinsäurebutylester
NsMeE	Nikotinsäuremethylester
Py-3-MeC	Pyridin-3-Methylcarbinol
RD	Radiochromatogramm
Zpm	Zerfälle pro Minute

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. BEHER, W.T. and O.H. GAEBLER — Studies of Antimetabolites: I. Pyridine-3-Sulfuric Acid and 3-Acetylpyridine. J.Biol.Chem. 188, 343 (1951)

2. BEHER, W.T., W.M. HOLLIDAY and O.H. GAEBLER — II. 3-Acetylpyridine. J.Biol.Chem. 198, 576 (1952)

3. BEHER, W.T. and W.L. ANTHONY — III. The Metabolism of 3-Acetylpyridine in Vivo. J.Biol.Chem. 203, 895 (1953)

4. BEHER, W.T., S.P. MARFEY, W.L. ANTHONY and O.H. GAEBLER — IV. The Metabolism of 3-Acetylpyridine in Vitro. J.Biol.Chem. 205, 521 (1953)

5. BEHER, W.T., G.D. BAUER and MADOFF — V. Metabolism in Vivo of 3-Acetylpyridine. J.Biol.Chem. 234, 2388 (1959)

6. BOYLAND, E. — Mercapturic Acid Conjugation and Biochemical Conjugation Processes. (Vortrag Stockholm 1961) referiert in: Biochemical Conjugation Processes. Biochem. Pharmak. 6, 61 (1961)

7. BRUNNEMANN, A., H. COPER und H. HERKEN — Isolierung von 3-APAD aus dem Gehirn 3-Ap-vergifteter Ratten. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 244, 223 (1962)

8. BRUNNEMANN, A., H.COPER und H. HERKEN
Biosynthese von 3ApADP aus NADP.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 245, 541 (1963)

9. BRUNNEMANN, A. und COPER, H.
Untersuchungen zur Wirkung des Pyridin-3-Methylcarbinol.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 247, 315 (1964)

10. CANTONI, G.L.
Methylation of Nicotinamide with a Soluble Enzymsystem from Rat Liver.
J.Biol.Chem. 189, 215 (1951)

11. COPER, H. und H.HERKEN
Pharmakologische Analyse der 3-Acetylpyridinvergiftung.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 243, 291 (1962)

12. COPER, H. und H.HERKEN
Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nikotinsäureamids.
DMW. 88, 42, 2096 (1963)

13. COPER, H. und D.NEUBERT
Reaktionsgeschwindigkeit NADP-abhängiger Oxydoreduktasen aus Rattengehirn mit 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotidphosphat.
J.Neurochem. 10, 513 (1963)

14. DAIBER, K. und H.THIERFELDER
Zur Kenntnis des Verhaltens fettaromatischer Ketone im Tierkörper.
Z.Physiol.Chem. 130, 380(1923)

15. DIRSCHERL, W.und H.THOMAS
4-Hydroxy-3-methoxy-phenylglyoxylsäure als Metabolit von Adrenalin und Noradrenalin.
Z.Physiol.Chem. 339, 115 (1964)

16. FUTTERMANN, S.
Enzymatic Reduction of Folic. Acid und Dihydrofolic Acid to Tetrahydrofolic Acid.
J.Biol.Chem. 228, 1031 (1957)

17. GÄNSHIRT, H. und A. MALZACHER — Trennung einiger Vitamine der B-Gruppe und des Vitamins C durch Dünnschichtchromatographie. Naturwissenschaften 47, 279 (1960)

18. GUNSALUS, J.C. and R.Y. STANIER — Benzoylformic Carboxylase. In: S.P. Colowick and N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Vol. II, 278, New York Academic Press, 1955

19. HANDLER, Ph., I. FRIDOVICH, K.V. RAJAGOPALAN — Hepatic Aldehyde Oxidase. J.Biol.Chem. 237, 922 (1962

20. HARRIS, T. — Untersuchung über den Stoffwechsel des 3-Acetylpyridin. Inaug.Diss., FU Berlin (1965)

21. HERKEN, H. und V. NEUHOFF — Mikroanalytischer Nachweis von Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid und Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotidphosphat im Gehirn. Hoppe-Seyler's Zschr.physiol. Chem. 331, 85 (1963)

22. HERKEN, H., V. NEUHOFF und F. WILLING — Der Austausch von 3-Acetylpyridin gegen Nikotinsäureamid in den Pyridinnukleotiden verschiedener Hirnregionen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 247, 254 (1964)

23. HOLZER, H. und P. SCRIBA — Gewinnung von α -Hydroxy-äthyl-2-Thiaminpyrophosphat mit Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel. Biochem. Zt. 334, 473 (1961)

24. KANIG, K. — Biologische Experimente mit Pyridin-3-methylcarbinol, einem Metaboliten des 3-Acetylpyridin. In: Bente, D. and P.B. Bradley (Eds.): Neuro-psychopharmacology, Vol. 4, 298 (1965), Elsevier, Amsterdam

25. KANIG, K., W. KORANSKY, G. MÜNCH und P.E. SCHULZE — Isolierung eines Metaboliten des 3-Acetylpyridin aus dem Gehirn und seine Identifizierung als Pyridin-3-Methylcarbinol. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 249, 43 (1964)

26. KAPLAN, N.O. and N.M. CIOTTI — The 3-Acetylpyridine Analogue of DPN. J.Am.Chem. Sec. 76, 1713 (1954)

27. KAPLAN, N.O., A. GOLDIN, S.R. HUMPHREYS, M.M. CIOTTI and J.M. VENDITTI — Significance of Enzymatically Catalyzed Exchange Reactions in Chemotherapy. Science 120, 437 (1954)

28. KAPLAN, N.O., M.M. CIOTTI and F.E. STOLZENBACH — Reaction of Pyridine Nucleotide Analogues with Dehydrogenases. J.Biol.Chem. 221, 833 (1956)

29. KAPLAN, N.O., RM. BURTON and M.R. LAMBORG — Relationship of Structure to Properties of Diphosphopyridine Nucleotide and Other Pyridinium Compounds. J.Am.Chem. Soc. 79, 6173 (1957)

30. KAPLAN, N.O., A. GOLDIN, S.R. HUMPHREYS, and F.E. STOLZENBACH — Pyridine Precursors of Mouse Liver Diphosphopyridine Nucleotide. J.Biol.Chem. 226, 365 (1957)

31. KNOX, W.E. — The Quinine Oxidizing Enzyme and Liver Aldehyde Oxidase. J.Biol.Chem. 163, 699 (1946)

32. LEIVER, E., L.J. ROTH, D.S. HOGNESS and M.H. CORSON
The Metabolism of radioactive Nicotine Acid and Nicotinamide.
J.Biol.Chem. 190, 595 (1951)

33. MATHEWS, C.K., K.G. SCRIMGEOUR and F.M. HUENNEKENS
Dihydrofolic Acid Reductase.
In: S.P. COLOWICK and N.O. Kaplan:
Methods in Enzymology, Vol.VI, p.364
Academic Press, New York and London, 1963

34. McKENNIS, H., E.R. BOWMAN, A. HORVATH and J.P. BEDERKA
Metabolic Release of Methyl Groups from a Series of N-Methylpyridinium Compounds.
Nature 202, 699 (1964)

35. McKENNIS, H., L.B. TURNBULL and E.R. BOWMAN
Additional Routes in the Metabolism of 3-Acetylpyridine.
J.Biol.Chem. 239, 1215 (1964)

36. McKENNIS, H., L.B. TURNBULL, E.R. BOWMAN and C.N. LUKHARD
Urinary Excretion of Conjugate Forms of 1-(3-Pyridyl)-ethanol after Administration of 3-Acetylpyridine.
J.Biol.Chem. 241, 1878 (1966)

37. NEUHOFF, V. und HARRIS, T.
Isolierung und Identifizierung von Metaboliten des 3-Acetylpyridin.
Naunyn-Schmiedebergs-Arch.exp. Path. 249, 11 (1964)

38. NEUHOFF, V.,und F.KÖHLER
Isolierung von Pyridin-3-methylcarbinol-glukuronid, einem Metaboliten des 3-Acetylpyridins.
Naturwissenschaften 52, 475 (1965)

39. NEUHOFF, V.
Pharmakologische Untersuchungen zur lokalisierten Vulnerabilität des Gehirns.
Habilitationsschrift, FU Berlin, 1966

40. NEUHOFF, V. und F.KÖHLER — Biochemische Analyse des Stoffwechsels von 3-Acetylpyridin. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 254, 301 (1966)

41. ÖSTERLE, W. — Über den Stoffwechsel des 3-Acetylpyridin in vitro. Inaug.-Diss., FU Berlin (1966

42. PULLMANN, M.E. and S.P. COLOWICK — Preparation of 2- and 6-Pyridones of N-Methylnicotinamide. J.Biol.Chem. 206, 121 (1954)

43. SCRIMGEOUR, K.G. and F.M. HUENNEKENS — Serine Hydroxymethylase. In: S.P. Colowick and N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Vol.5, 838, Academic Press, New York, 1955

44. TISCHER, — Inaug. Dissertation, FU Berlin noch nicht veröffentlicht

45. UMBREIT, W.M., R.H. BURRIS and J.F. STAUFFER — Manometric Techniques. Erschienen bei: Burgess Publishing CO., 1959

46. WOOLLEY, D.W., F.M. STRONG and R.J. MADDEN — Anti-Black Tongue Activity of Various Pyridine Derivatives. J.Biol.Chem. 124, 715 (1938)

47. WOOLLEY, D.W. — Production of Nicotinic Acid Deficiency with 3-Acetylpyridine, the Ketone Analogue of Nicotinic Acid. J.Biol.Chem. 157, 455 (1945)

Herrn Direktor Professor Dr. med. Herken bin ich zu Dank verpflichtet für die Möglichkeit, in seinem Institut arbeiten zu dürfen.

Herrn Professor Dr. med. Koransky danke ich für die Themenstellung und die stets gewährte hilfreiche Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Portig gilt mein Dank, der mich in die pharmakologischen Arbeitsmethoden eingeführt hat.

Fräulein Noak und Herrn Münch danke ich für viele praktische Hinweise.

L e b e n s l a u f

Am 12.12.1940 wurde ich, als Kind des Pius Heidinger und seiner Ehefrau Lisbeth, geb. Hilse, in Berlin geboren.

Die Grundschule besuchte ich von 1947 bis 1953 in Berlin-Charlottenburg.

Von 1953 bis 1960 war ich Schüler des neusprachlichen Zuges des Gottfried-Keller-Gymnasiums in Berlin-Charlottenburg.

Nach bestandener Reifeprüfung am 5.3.1960 begann ich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. Hier legte ich 1962 das Physikum ab.

Nach je einem klinischen Semester in Kiel und in Wien setzte ich mein Studium in Berlin fort, wo ich am 19.10.1966 das Staatsexamen bestanden habe.

Während der Medizinalassistentenzeit war ich inzwischen in der Kinderklinik Berlin-Wedding und in der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Berlin-Spandau tätig.

Im März 1964 begann ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin mit den Untersuchungen, deren Ergebnisse die vorliegende Arbeit darstellt.